

Aus dem Institut für Zytobiologie und Zytopathologie

Direktor: Prof. Dr. Roland Lill

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Einfluss des Transkriptionsfaktors Miz1 auf die Regulation des Autophagieprozesses in Fibroblasten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sophie Berliner aus Dachau
Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 06.08.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer

Koreferent: Prof. Dr. Alexander Brehm

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Autophagie	1
1.1.1 Biologische Funktion der Autophagie	1
1.1.2 Mechanismus der Makroautophagie	2
1.1.3 Molekularer Mechanismus der Autophagie	3
1.1.4 Atg5/Atg7-unabhängige, alternative Makroautophagie	7
1.1.5 Regulation der Autophagie	8
1.1.6 Klinische Bedeutung der Autophagie	11
1.2 Transkriptionsfaktor Miz1	13
1.2.1 Funktion von Miz1	14
1.2.2 Interaktionspartner von Miz1	15
1.2.3 Interaktion von Miz1 mit ARF, p53 und Myc und der Einfluss auf die Autophagie	18
1.3 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Plastik- und Glaswaren	23
2.1.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	23
2.1.4 Software und Internet Seiten	24
2.1.5 Verwendete Antikörper	25
2.1.6 Verwendete Zelllinien	25
2.1.7 Verwendete Plasmide	26
2.1.8 Reagenzien, Kits und sonstige Materialien	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellkultur	26
2.2.1.1 Kultivierung adhärenter Zellen	26
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl	27
2.2.1.3 Stimulation zu Autophagie	27
2.2.1.4 Retrovirale Infektion von ΔPOZ 3T3 MEFs und MEFs ^{ARF}	28
2.2.1.5 Bestimmung der Infektionseffizienz	29
2.2.2 Elektronenmikroskopie	29
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	31
2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.3.2 Real time PCR (qPCR)	33
2.2.3.3 Ligation	37
2.2.3.4 Transformation	40
2.2.3.5 Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA	41

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.6	Restriktionsverdau	44
2.2.3.7	Agarosegel-Elektrophorese	45
2.2.3.8	Synthese von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden durch in vitro Transkription für einen RNase Protection Assay	47
2.2.3.9	RNA-Isolierung	49
2.2.3.10	DNase-Verdau der RNA	49
2.2.3.11	Konzentrationsbestimmung mittels Photometrie	51
2.2.3.12	cDNA-Synthese	51
2.2.4	Proteinbiochemie	51
2.2.4.1	Herstellung eines Gesamtzelllysats für die Immunpräzipitation	51
2.2.4.2	BCA-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung	52
2.2.4.3	Immunpräzipitation	52
2.2.4.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	53
2.2.4.5	Westernblot	54
2.2.4.6	Immundetektion	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Einfluss des Knockouts der POZ-Domäne von Miz1 und Inkubation mit EBSS auf die Expression Autophagie-assoziiierter Gene und Myc	56
3.1.1	Qualitätsnachweis der verwendeten RNAs	56
3.1.2	Genexpressionsanalyse in 3T3 MEFs	58
3.1.2.1	Nachweis des Knockouts der POZ-Domäne von Miz1 und Induzierbarkeit von Miz1 durch EBSS	58
3.1.2.2	Einfluss der Miz1 POZ-Domäne auf die Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene	59
3.1.2.3	Regulation der Genexpression durch EBSS und Einfluss der POZ-Domäne von Miz1	61
3.1.3	Genexpressionsanalyse in p19 ^{ARF} shRNA immortalisierten MEFs	66
3.1.3.1	Nachweis des Knockouts der POZ-Domäne von Miz1 und Induzierbarkeit von Miz1 durch EBSS	66
3.1.3.2	Einfluss der Miz1 POZ-Domäne auf die Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene	67
3.1.3.3	Regulation der Genexpression durch EBSS und Einfluss der POZ-Domäne von Miz1	70
3.2	Substitution von humanem Miz1 durch retrovirale Infektion	73
3.2.1	Nachweis der Miz1-Substitution auf Proteinebene	74
3.2.2	Einfluss der retroviralen hMiz1-Substitution auf die Genexpression	76
3.2.2.1	Qualitätsnachweis der verwendeten RNAs	76
3.2.2.2	Genexpressionsanalyse in mit pB- \emptyset und pB-Miz1 infizierten Δ POZ 3T3 MEFs	78
3.2.2.3	Genexpressionsanalyse in mit pB- \emptyset und pB-Miz1 infizierten Δ POZ MEFs ^{ARF}	82
3.2.3	Einfluss der retroviralen hMiz1-Substitution auf die Morphologie	85
3.3	Herstellung von Sonden für einen RNase Protection Assay	92
3.3.1	Klonierung von DNA-Sequenzen Autophagie-assoziiierter Gene in den Vektor pCR [®] 2.1	92
3.3.2	Umklonierung von pCR [®] 2.1 in pBluescript	96
3.3.2.1	Isolieren der DNA-Fragmente aus dem Vektor pCR [®] 2.1	96
3.3.2.2	Linearisierung des Bluescript-Vektors	97

Inhaltsverzeichnis

3.3.2.3	Klonierung der Ziel-DNA-Sequenzen in den Bluescript Vektor	97
3.3.3	Sequenzierungsergebnisse	101
3.3.4	Synthese von sense und antisense RNA-Sonden	104
4	Diskussion	106
4.1	Einfluss von Autophagiestimulation auf die Expression von Miz1	107
4.2	Morphologische Unterschiede von MEFs mit oder ohne funktionstüchtigem Miz1 in Hinblick auf das lysosomal-autophagische Kompartiment	108
4.3	Einfluss von Miz1 auf die Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene	110
4.3.1	Transkriptionelle Regulation von Myc durch Miz1	111
4.3.2	Einfluss von Miz1 auf die Teilschritte des autophagischen Prozesses	113
4.3.2.1	Einfluss auf die Initiation der Autophagosomenbildung	113
4.3.2.2	Einfluss auf die Reifung von Autophagosomen	114
4.3.2.3	Einfluss auf den Membrantransport	116
4.3.3	Konventionelle Makroautophagie vs. Atg5/Atg7-unabhängige, alternative Makroautophagie	119
4.3.4	Einfluss von ARF auf die Regulation der Genexpression durch Miz1	120
5	Zusammenfassung	124
5.1	Deutsche Zusammenfassung	124
5.2	Englische Zusammenfassung	125
	Abkürzungsverzeichnis	127
	Literaturverzeichnis	129
	Anhang	A-1

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Autophagosomenreifung	3
1.2	Induktion der Autophagie	4
1.3	Initiierung der Autophagie durch den ULK1/2-Atg13-FIP200-Komplex	5
1.4	Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme	6
1.5	Regulation der Autophagie über den mTOR Signalweg	9
1.6	Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors Miz1	14
2.1	Methode des TA Cloning® (Invitrogen, Darmstadt)	38
2.2	Vektorkarte von pCR®2.1 (Invitrogen, Darmstadt)	38
2.3	Vektorkarte von pBluescript II Phagemid (Stratagene, Heidelberg)	39
2.4	TriDye™ 2-Log DNA Ladder (NEB, Schwalbach)	46
3.1	Aus 3T3 MEFs und MEFs ^{ARF} isolierte und DNase-verdaute RNA	57
3.2	Expressionsanalyse von Miz1 in 3T3 MEFs	58
3.3	In 3T3 MEFs Miz1-unabhängig exprimierte Gene (<i>3T3</i> 1-1)	60
3.4	Gene, für deren Expression in 3T3 MEFs die Miz1-Abhängigkeit unbestimmt ist (<i>3T3</i> 1-2)	60
3.5	In 3T3 MEFs Miz1-abhängig exprimierte Gene (<i>3T3</i> 1-3)	61
3.6	In 3T3 MEFs nicht durch EBSS regulierte Gene (<i>3T3</i> 2-1)	62
3.7	Gene, für deren Expression in 3T3 MEFs eine Regulation durch EBSS unbestimmt ist (<i>3T3</i> 2-2)	63
3.8	Schema für die Einteilung der durch EBSS regulierten Gene	64
3.9	Miz1-unabhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in 3T3 MEFs (<i>3T3</i> 2-3)	65
3.10	Unbestimmte Miz1-Abhängigkeit der Regulation durch EBSS in 3T3 MEFs (<i>3T3</i> 2-4)	66
3.11	Expressionsanalyse von Miz1 in MEFs ^{ARF}	67
3.12	In MEFs ^{ARF} Miz1-unabhängig exprimierte Gene (<i>ARF</i> 1-1)	68
3.13	Gene, für deren Expression in MEFs ^{ARF} die Miz1-Abhängigkeit unbestimmt ist (<i>ARF</i> 1-2)	69
3.14	In MEFs ^{ARF} Miz1-abhängig exprimierte Gene (<i>ARF</i> 1-3)	69
3.15	Gene, für deren Expression in MEFs ^{ARF} eine Regulation durch EBSS unbestimmt ist (<i>ARF</i> 2-2)	70
3.16	Miz1-unabhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in MEFs ^{ARF} (<i>ARF</i> 2-3)	71
3.17	Unbestimmte Miz1-Abhängigkeit der Regulation durch EBSS in MEFs ^{ARF} (<i>ARF</i> 2-4)	72
3.18	Miz1-abhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in MEFs ^{ARF} (<i>ARF</i> 2-5)	73
3.19	Immundetektion von Miz1 in infizierten ΔPOZ 3T3 MEFs (Experiment 2)	75
3.20	Immundetektion von Miz1 in infizierten ΔPOZ 3T3 MEFs (Experiment 3)	76
3.21	Aus mit pB-⊖ und pB-Miz1 infizierten ΔPOZ MEFs isolierte und DNase verdaute RNA	77
3.22	Abhängigkeit der Genexpression von der POZ-Domäne von hMiz1 in infizierten ΔPOZ 3T3 MEFs	79

Abbildungsverzeichnis

3.23 Miz1-unabhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in infizierten Δ POZ 3T3 MEFs (<i>Inf3T3</i> 2-3)	80
3.24 Miz1-abhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in infizierten Δ POZ 3T3 MEFs (<i>Inf3T3</i> 2-5)	81
3.25 Von der POZ-Domäne unabhängige Genexpression in infizierten Δ POZ MEFs ^{ARF} (<i>InfARF</i> 1-1)	82
3.26 Von der POZ-Domäne abhängige Genexpression in infizierten Δ POZ MEFs ^{ARF} (<i>InfARF</i> 1-3)	83
3.27 Miz1-unabhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in infizierten Δ POZ MEFs ^{ARF} (<i>InfARF</i> 2-3)	84
3.28 Miz1-abhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in infizierten Δ POZ MEFs ^{ARF} (<i>InfARF</i> 2-5)	85
3.29 Schematische Zeichnung der drei Vakuolentypen	86
3.30 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Typ I Vakuolen	87
3.31 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Typ II Vakuolen	88
3.32 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Typ III Vakuolen	89
3.33 Schematische Übersicht über die Verteilung der Vakuolentypen	90
3.34 Elektronenmikroskopische Übersichtsbilder der untersuchten Zellen	91
3.35 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit pB-Miz1 infizierten und mit EBSS inkubierten Δ POZ-Zelle	92
3.36 In den Vektor pCR [®] 2.1 klonierte PCR-Produkte	93
3.37 Verdau der Mini-Präparationen des Vektors pCR [®] 2.1	94
3.38 Verdau der Maxi-Präparationen des Vektors pCR [®] 2.1	95
3.39 Isolierung der DNA Fragmente	96
3.40 Verdau der Mini-Präparationen des Bluescript-Vektors I	98
3.41 Verdau der Maxi-Präparationen des Bluescript-Vektors I	99
3.42 Verdau der Mini-Präparationen des Bluescript-Vektors II	100
3.43 Verdau der Maxi-Präparationen des Bluescript-Vektors II	104
3.44 Für Sondensynthese linearisierter Vektor pBluescript mit DNA-Insert β -Aktin und GAPDH	105

Tabellenverzeichnis

2.1	Häufig verwendete Geräte	22
2.2	Plastik und Glaswaren in der Zellkultur	23
2.3	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	24
2.4	Software und Internet Seiten	24
2.5	Verwendete Antikörper	25
2.6	Verwendete Zelllinien	25
2.7	Plasmide, die über eine retrovirale Infektion in Δ POZ-Knockout Zellen eingebracht wurden	26
2.8	Reagenzien und Kits	26
2.9	Kultivierung adhärenter Zellen	27
2.10	Reagenzien in der Elektronenmikroskopie	30
2.11	Liste der verwendeten Primer für die herkömmliche PCR	32
2.12	Liste der verwendeten Primer für die qPCR	35
2.13	Reagenzien für die Transformation	40
2.14	Reagenzien für die Mini-Präparation	42
2.15	Restriktionsverdau, analytischer Ansatz	44
2.16	Restriktionsverdau, präparativer Ansatz	44
2.17	Reagenzien für die Agarosegel-Elektrophorese	46
2.18	Reagenzien für den BCA-Assay	52
2.19	Reagenzien für das Polyacrylamidgel	54
3.1	Sequenzen der Klone, die für die Sondensynthese ausgewählt wurden	103
4.1	Übersicht über die gemessenen Genexpressionen	122
A.1	Abhängigkeit der Genexpression von der POZ-Domäne von Miz1 bei Kultivierung in Vollmedium	A-2
A.2	Regulation der Genexpression durch EBSS und Einfluss der POZ-Domäne von Miz1	A-4

1 Einleitung

1.1 Autophagie

Autophagie ist ein physiologischer Prozess in eukaryotischen Zellen, welcher einen intrazellulären „Selbstverdau“ ermöglicht. Es handelt sich um einen evolutionär hoch konservierten Vorgang. Dieser erlaubt der Zelle zytoplasmatisches Material und ganze Organellen mit Hilfe lysosomaler Enzyme abzubauen und zu recyceln. Dadurch wird die Zelle in die Lage versetzt, auf Stressoren zu reagieren und sich veränderten Umweltbedingungen anzupassen [Burman and Ktistakis, 2010; Eskelinen and Saftig, 2009; Glick et al., 2010; Yang and Klionsky, 2010b].

Es existieren drei verschiedene Formen der Autophagie in Säugetierzellen, die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie [Yang and Klionsky, 2009]. Die drei Arten unterscheiden sich in dem Weg, auf dem das abzubauende Material in das Lumen der Lysosomen transportiert wird. Bei der Makroautophagie wird zytoplasmatisches Material von einem spezialisierten Organell, dem Autophagosom, umschlossen und es kommt dann zu einer Verschmelzung des Autophagosoms mit einem Lysosom [Eskelinen and Saftig, 2009]. Bei der Mikroautophagie wird zytoplasmatisches Material direkt vom Lysosom durch Invagination der lysosomalen Membran aufgenommen [Glick et al., 2010]. Der Abbau von speziell markierten Proteinen findet bei der Chaperon-vermittelten Autophagie statt. Das lysosomale Membranprotein LAMP-2A erkennt dabei die an das Chaperon Hsc-70 gebundenen Proteine und vermittelt die Aufnahme in das Lysosom. [Cuervo and Dice, 1996; Glick et al., 2010]

1.1.1 Biologische Funktion der Autophagie

Autophagie wird von allen eukaryotischen Zellen betrieben und übernimmt vielfältige physiologische Aufgaben [Yang and Klionsky, 2009]. Die Rate an Autophagie und die Art des Materials, das im Autophagosom sequestriert wird, kann je nach Situation verändert und den aktuellen Bedürfnissen der Zelle angepasst werden. Die klassische Rolle der Autophagie ist die Sicherung des Überlebens unter Hungerbedingungen durch die Bereitstellung von Energiereserven. In der Hefe konnte gezeigt werden, dass die Zellen den autophagischen Abbau von Zellbestandteilen für einen begrenzten Zeitraum für die ATP-Gewinnung nutzen und so kurze Perioden von Nahrungsmangel überbrücken können [Lum et al., 2005; Ryan, 2010]. Experimente an Mäusen, die aufgrund eines Knockouts eines essentiellen Autophagiegens einen Defekt der Autophagie aufwiesen, zeigten, dass dieser Mechanismus für Säugetiere ebenso essentiell ist. Durch Autophagie kann der Energieengpass, der kurz nach der Geburt durch die Umstellung der Ernährung von der Versorgung durch die Plazenta zur oralen Nahrungsaufnahme entsteht, überbrückt werden [Kuma et al., 2004].

Es sind zahlreiche Faktoren bekannt, die Autophagie induzieren können, wie z.B. Aminosäure- oder Wachstumsfaktorenentzug, niedrige intrazelluläre Energiespiegel, Hypoxie und oxidativer Stress [Levine and Klionsky, 2004; Ravikumar et al., 2010]. Ein basales Maß an Autophagie wird dagegen ständig in der Zelle aufrechterhalten und dient der Zellhomöostase. So werden Proteinagregate, beschädigte Organellen und andere Substanzen durch Autophagie abgebaut. Autophagie vervollständigt die Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems, das unter anderem den Abbau von meist kurzlebigen Proteinen regelt, die durch die Markierung mit Ubiquitin von Proteasomen für den Abbau erkannt werden [Levine and Klionsky, 2004; Mehrpour et al., 2010a]. Durch den stetigen Umsatz zytoplasmatischer Bestandteile übernimmt basale Autophagie somit eine wichtige Funktion für die intrazelluläre Qualitätskontrolle [Mizushima, 2009].

Der Autophagie wird eine entscheidende Rolle für den Alterungsprozess von Zellen zugeschrieben. Während die Fähigkeit zu Autophagie mit dem Alter abnimmt, kann die Aufrechterhaltung autophagischer Aktivität durch reduzierte Kalorienaufnahme die Lebensspanne zahlreicher Spezies möglicherweise verlängern [Cuervo et al., 2005]. Weiterhin ist bekannt, dass die Autophagie wichtige Funktionen in der Zelldifferenzierung und -entwicklung von Säugetieren übernimmt [Mizushima and Levine, 2010]. Sie ist beteiligt beim programmierten Zelltod Typ II und spielt eine wichtige Rolle für die angeborene und erworbene Immunität und die Abwehr von Pathogenen. [Eskelinen and Saftig, 2009]

1.1.2 Mechanismus der Makroautophagie

Da für diese Arbeit die Makroautophagie von besonderem Interesse ist, sollen die Schritte der Makroautophagie genauer dargestellt werden. Im Folgenden wird für „Makroautophagie“ der Begriff „Autophagie“ synonym verwendet.

Auf ein Stimulationssignal hin wird im ersten Schritt der Autophagie eine Doppelmembran gebildet, die sogenannte Phagophore oder „Isolation Membrane“ (in dieser Arbeit auch als Isolationsmembran bezeichnet), die sich schrittweise verlängert und dabei zytoplasmatisches Material umschließt. Schließlich formt sie sich zu einer abgegrenzten Vakuole, dem Autophagosom. Die Herkunft der initialen Doppelmembran wird seit 50–60 Jahren diskutiert [Eskelinen, 2008a], konnte allerdings bislang nicht eindeutig geklärt werden. In Hefe konnte als Entstehungsort der Phagophore die prä-autophagosomale Struktur (PAS) identifiziert werden [Suzuki et al., 2001]. In Säugerzellen gibt es jedoch keine Hinweise für einen einzelnen, vergleichbaren spezialisierten Entstehungsort [Yang and Klionsky, 2009]. Es wurden neben der Plasmamembran, das ER, der Golgi-Apparat und die Mitochondrien als mögliche Quelle für die initiale Doppelmembran diskutiert [Eskelinen, 2008a]. Neuere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass der Ursprung der Doppelmembran im ER liegen könnte. Demnach entsteht die Phagophore im sogenannten Omegasom, einer kleinen Struktur, die mit dem ER in Verbindung steht und als Plattform für die Autophagosomenbildung dient [Axe et al., 2008; Tooze and Yoshimori, 2010].

Nach der Fusion der Phagophorenmembran durchläuft das Autophagosom eine Reihe von Reifungsschritten, in denen es zur Verschmelzung mit Endosomen und/oder Lysosomen kommt (Abbildung 1.1 auf Seite 3). Verschmilzt das Autophagosom mit einem Endosom, wird es Amphisom

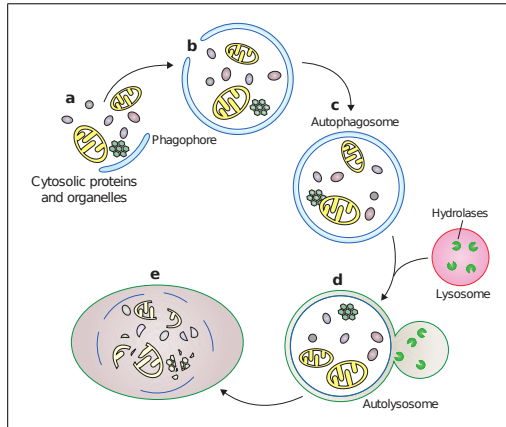


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Autophagosomenreifung. (a und b) zytoplasmatisches Material wird von der sich verlängernden Doppelmembran des Phagophors umschlossen; (c) die Phagophorenmembran schließt sich zum Autophagosom; (d) durch Verschmelzung mit einem Lysosom, reift das Autophagosom zum Autolysosom; (e) mit Hilfe saurer Hydrolasen erfolgt der Abbau zytoplasmatischen Materials. Nach [Xie and Klionsky, 2007]

genannt (nicht dargestellt in Abb. 1.1). Fusioniert ein Amphisom oder ein Autophagosom mit einem Lysosom, entsteht ein Autolysosom. Die Reifungsschritte dienen dazu, den Inhalt des Autolysosoms anzusäuern, um ein pH-Optimum für hydrolytische Enzyme zu schaffen, die während der Reifung durch die Fusionsschritte aufgenommen werden. Das zytoplasmatische Material, das im Autophagosom eingeschlossen ist, wird nun durch lysosomale Hydrolasen abgebaut und die Abbauprodukte stehen, nachdem sie zurück ins Zytoplasma transportiert worden sind, für eine Neuverwertung zur Verfügung [Dunn, 1990; Eskelinen, 2005].

Das korrekte Funktionieren der oben genannten Schritte ist essentiell für einen reibungslosen Fluss von Material durch den autophagischen Kreislauf. Jede Störung der Autophagosomenreifung oder des lysosomalen Systems würde zur Behinderung des autophagischen Flusses führen und damit zur Anhäufung autophagischer Vakuolen [Mehrpour et al., 2010b].

1.1.3 Molekularer Mechanismus der Autophagie

Morphologische Untersuchungen der Autophagie wurden bereits in den 1950er Jahren an Säugtierzellen durchgeführt. Die Erforschung des molekularen Mechanismus begann in den 1990er Jahren in Hefezellen [Baba et al., 1994; Harding et al., 1996; Schlumpberger et al., 1997; Takeshige et al., 1992; Thumm et al., 1994; Tsukada and Ohsumi, 1993]. Zurzeit sind ca. 32 verschiedene Autophagie-assoziierte Gene (Atg) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bekannt [Glick et al., 2010]. In höheren Eukaryoten konnten Homologe dieser Gene gefunden werden [Klionsky et al., 2003]. Da sich im Laufe der Evolution einige Gene dupliziert haben, existieren in vielen Spezies

mehrere paraloge Genkopien. Paraloga sind Gene, die durch Genduplikation entstanden sind und meist unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen [Koonin, 2005].

Um Missverständnisse bezüglich der Bezeichnung von Genen, die in der Autophagie beteiligt sind, zu vermeiden, wurde eine einheitliche Nomenklatur für Gene und Proteine festgelegt [Klionsky et al., 2003]. Die Proteine werden mit dem gleichen Namen und der gleichen Nummer wie das zugehörige Gen benannt.

Initiation der Autophagosomenbildung

Der Ort der Autophagosomenbildung ist bei Hefen die phagophore assembly site (PAS). In Säugerzellen können sich Autophagosomen dagegen an vielen Stellen der Zelle bilden [He and Klionsky, 2009]. Die Phagophore verlängert sich unter Mitwirkung von Atg-Proteinen und wandelt sich schließlich in ein Autophagosom um [Xie and Klionsky, 2007]. An der Initiation der Autophagosomenbildung sind mindestens zwei Komplexe beteiligt, der ULK1/2-Atg13-FIP200-Komplex und der Beclin 1:Vps34 Komplex (Abbildung 1.2).

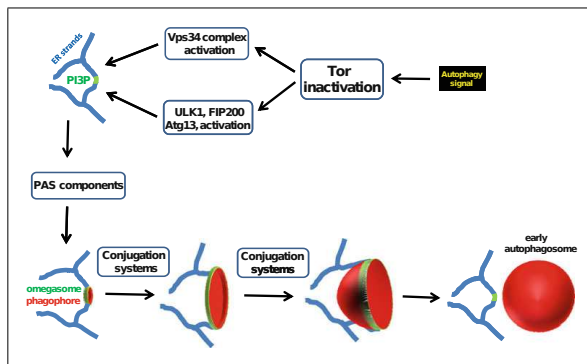


Abbildung 1.2: Induktion der Autophagie. Die Inaktivierung von TOR ist ein starker Stimulus zur Autophagie und führt zur Aktivierung des ULK1/2-Atg13-FIP200-Komplexes. Die Synthese von PI3P durch den Beclin 1:Vps34 Komplex ist ebenfalls essentiell für die Initiation der Autophagosomenbildung. Omegasomen (grün) sind PI3P-reiche Membranen, die sich am ER bilden. Aus ihnen formt sich die Phagophorenmembran, die sich unter Mitwirkung des Atg12- und LC 3-Konjugationssystems in ein Autophagosom (rot) umwandelt. Nach [Burman and Ktistakis, 2010]

Die Ausbildung der Phagophore nach Induktion der Autophagie wird von einem zentralen Komplex initiiert, der bei Säugern die Proteine ULK1 und ULK2 (in der Hefe Atg1), Atg13 und FIP200 beinhaltet. Zentraler Regulator dieses Komplexes ist target of rapamycin complex 1 (TORC1), der unter nährstoffreichen Bedingungen an ULK1/2 bindet und diese sowie Atg13 phosphoryliert und damit inaktiviert. Unter Hungerbedingungen dissoziiert inaktiviertes TORC1 von ULK1/2 und bewirkt hierdurch eine partielle Dephosphorylierung von ULK1/2. Diese wiederum phosphorylieren FIP200 und es kommt zum Start der Autophagosomenbildung (Abbildung 1.3 auf Seite 5) [Escalante et al., 2009; Yang and Klionsky, 2010b]. Das Protein Atg101, das kürzlich entdeckt wurde (nicht

1 Einleitung

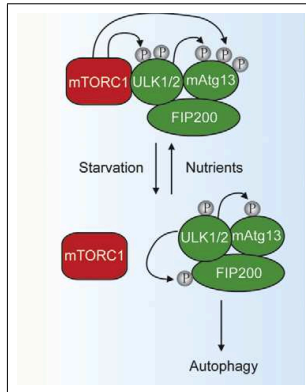


Abbildung 1.3: Initiierung der Autophagie durch den ULK1/2-Atg13-FIP200-Komplex. Als zentraler Regulator des Komplexes fungiert TORC1. Aus [Yang and Klionsky, 2010b]

gezeigt), scheint ebenfalls an dem Komplex beteiligt zu sein und eine entscheidende Rolle bei der Autophagosomenbildung zu spielen [Hosokawa et al., 2009; Mercer et al., 2009].

Für die Rekrutierung der initialen Phagophorenmembran ist außerdem der Beclin 1:Vps34 Komplex essentiell. Er beinhaltet Vps34, eine Klasse III Phosphatidylinositol 3-Kinase, Beclin 1 (in der Hefe Atg6), p150 und Atg14L (auch als Beclin 1-associated ATG key regulator (Barkor) bezeichnet). Vps34 phosphoryliert Phosphatidylinositol (PI), so dass Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PI3P oder auch als PtdIns3P abgekürzt) entsteht. PI3P spielt in der Hefe und in Säugerzellen eine wichtige Rolle bei der Induktion der Autophagie und ist an der Autophagosomenbildung beteiligt [Burman and Ktistakis, 2010; Mehrpour et al., 2010b]. Es wird vermutet, dass sich Autophagosomen innerhalb sogenannter Omegasomen bilden. Diese Omegasomen stehen in Kontakt mit dem ER und scheinen reich an PI3P zu sein, das wahrscheinlich durch Vps34 gebildet wird [Axe et al., 2008; Burman and Ktistakis, 2010]. Es existieren zahlreiche Regulatoren, die die Synthese von PI3P steuern. Zu den Proteinen, welche die Synthese von PI3P fördern und dadurch Autophagie verstärken, gehören unter anderem UV irradiation resistance-associated gene (UVRAG), Bax-interacting factor 1 (Bif-1) und Ambra, während Proteine der Bcl-2 Familie und RUN domain and cysteine-rich domain containing Beclin-1-interacting protein (Rubicon) Autophagie inhibieren [Burman and Ktistakis, 2010; Glick et al., 2010]. Bcl-2 und andere antiapoptotische Proteine aus der Bcl-2 Familie interagieren dabei direkt mit Beclin 1, indem sie an dessen BH3-Domäne binden und auf diese Weise die autophagische Funktion von Beclin 1 hemmen [Funderburk et al., 2010].

Membranelongation

Nach Ausbildung der Phagophore kommt es zur Elongation der Phagophorenmembran und schließlich zum Schluß des Autophagosoms. Es konnten zwei Proteine identifiziert werden, die eine zentrale Rolle für die Verlängerung und den Schluß der Membran spielen. Atg12 und LC3 sind Teil

zweiter „Ubiquitin-ähnlicher Konjugationssysteme“, die so benannt sind, da ihre Wirkungsweisen dem Ubiquitinsystem sehr ähneln.

Ubiquitin ist ein Protein, das zur Namensgebung einer ganzen Gruppe von Proteinen beigetragen hat. Als sogenannte ubiquitin-like proteins (Ubls) werden solche Proteine bezeichnet, die in ähnlicher Art und Weise wie Ubiquitin andere Proteine modifizieren können. Die am besten untersuchte Aufgabe von Ubiquitin ist die Markierung von Proteinen für den Abbau durch das Proteasom. Dies geschieht durch Anheftung von Ubiquitin-Molekülen in Form eines Poly-Ubiquitin-Schwanzes an das abzubauen Protein; der Schwanz wird dann von spezifischen Rezeptoren des Proteasoms erkannt, was zum Abbau des entsprechenden Proteins führt [Kerscher et al., 2006].

Eines der in der Autophagie wichtigen Ubls ist Atg12. Es wird auf ähnliche Weise wie Ubiquitin auf eine Zielstruktur übertragen. Die Bindung von Atg12 an Atg5 wird durch Atg7 und Atg10 vermittelt [Mizushima et al., 1998]. Der Komplex aus Atg5 und Atg12 wird dann durch Atg16 stabilisiert und es bildet sich ein multimerer Komplex [Mizushima et al., 1999]. Dieser ist essentiell für die Konjugationsreaktion von LC3 an Phosphatidylethanolamin (PE). LC3 (in der Hefe Atg8) ist ein weiteres wichtiges Ubl. Es wird zunächst durch die Cystein-Protease Atg4 modifiziert [Kirisako et al., 2000]. Die um eine Aminosäure verkürzte Form von LC3 (LC3-I) wird nun auf Atg7, dann auf Atg3 und zum Schluß auf PE übertragen. Die an PE gebundene Form von LC3 wird auch als LC3-II bezeichnet [Ichimura et al., 2000].

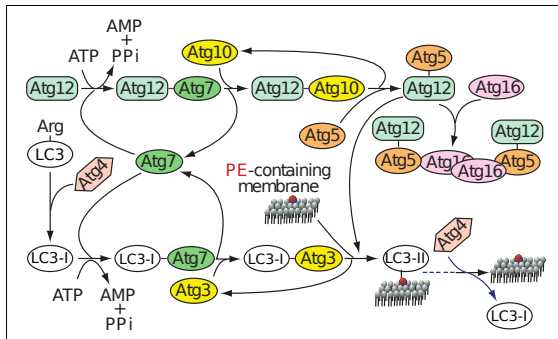


Abbildung 1.4: Elongation und Schluß der Phagophorenmembran durch „Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme“. Atg12 wird unter Mithilfe zwischengeschalteter Proteine auf Atg5 übertragen, LC3-I wird über Zwischenschritte an Phosphatidylethanolamin (PE) gebunden. An PE gebundenes LC3-I wird als LC3-II bezeichnet. Sowohl für die Modifikation von LC3 zu LC3-I als auch für das Recycling von LC3-II zu LC3-I wird Atg4 benötigt. Modifiziert nach [Chen and Klionsky, 2011]

Die Atg12- und LC3-Konjugationssysteme sind essentiell für die Autophagie. Es konnte gezeigt werden, dass ein Ausfall einer der Komponenten der beiden Konjugationssysteme die korrekte Autophagosomenbildung verhindert [Xie and Klionsky, 2007]. Die primäre Aufgabe der Konjugationssysteme liegt in der Elongation der Phagophorenmembran, während die initiale Ausbildung der Phagophore von den Atg12- und LC3-Konjugationssystemen unabhängig verläuft.

Der Atg12-Atg5-Atg16 Komplex befindet sich auf der äußeren Seite der autophagosomalen Doppelmembran und dissoziiert von ihr kurz vor oder nach dem Schluss des Autophagosoms. Er wird für die korrekte Lokalisierung von LC3 an die Membran benötigt und ist essentiell für die LC3-Lipidierung [Geng and Klionsky, 2008; Mizushima et al., 2003]. LC3-II ist auf beiden Seiten der Doppelmembran lokalisiert und bildet das Grundgerüst für die Membranverlängerung. Während der Teil des LC3-II, der sich auf der Innenseite der Membran befindet, nach Schluß des Autophagosoms dem lysosomalen System zugeführt und in Aminosäuren zerlegt wird, wird das LC3-II auf der äußeren Seite durch Atg4 von PE abgespalten und steht somit für eine neue Reaktion im Zytosol zur Verfügung [Geng and Klionsky, 2008; Kabeya et al., 2000; Kirisako et al., 2000]. Für den Schluß des Autophagosoms ist die Dissoziation von LC3-II von der Membran wichtig, so dass LC3 in jedem Zyklus der Autophagosomenbildung zunächst an die sich verlängernde Membran des Phagophors rekrutiert wird, um dann wieder abgespalten zu werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass LC3 eine entscheidende Rolle in der Regulation der Autophagosomengröße spielt [Xie et al., 2008].

Transmembranprotein Atg9

Atg9 ist ein Transmembranprotein, das eine wichtige Rolle für den autophagischen Membrantransport spielt [Noda et al., 2000]. Untersuchungen in Atg9 Knockout Mäusen, die alle innerhalb eines Tages nach Geburt starben, bestätigen die wichtige Funktion von Atg9 für autophagische Prozesse in Säugerzellen [Saitoh et al., 2009]. Unter normalen Nährstoffbedingungen ist Atg9 am Trans-Golgi Netzwerk und an peripheren Endosomen lokalisiert. Es wird vermutet, dass Atg9 unter basalen Bedingungen zwischen diesen beiden Regionen pendelt. Ändert sich die Nährstofflage geht dies mit einer Umverteilung von Atg9 einher. Unter Hungerbedingungen wird Atg9 nun vor allem in peripheren Regionen gefunden, die mit Autophagosomenmarkern wie LC3-GFP kolokalisieren [Young et al., 2006]. Es wird vermutet, dass Atg9 als Quelle für Lipide, die bei der Entstehung von Autophagosomen benötigt werden, dient und es wird ihm eine Aufgabe als „Träger“ dieser Lipide zugeschrieben [Webber and Tooze, 2010b; Yang and Klionsky, 2009]. In Säugerzellen, in denen die Expression von Atg9 durch einen siRNA vermittelten Knockdown verringert wurde, konnte ein Defekt der Autophagie in Form einer verminderten Lipidierung von LC3 und einem verringerten Abbau langlebiger Proteine nachgewiesen werden [Young et al., 2006]. Möglicherweise spielt Atg9 außerdem eine wichtige Rolle für die Initiation des Phagophors und zusammen mit LC3-II und anderen Atg-Proteinen scheint es zu Fusionsprozessen beizutragen, die das Phagophor zum Autophagosom verlängern [He et al., 2008]. Eine neue Studie geht davon aus, dass Atg9 möglicherweise an der Regulation der Autophagosomengröße beteiligt sein könnte [Geng et al., 2008]. In der Heffe konnten einige Bindungspartner von Atg9 identifiziert werden. Die vollständige Funktion bleibt aber weiterhin unklar [Webber and Tooze, 2010b].

1.1.4 Atg5/Atg7-unabhängige, alternative Makroautophagie

Neben dem am häufigsten beschriebenen Weg der Makroautophagie wurde kürzlich von Nishida und Kollegen ein alternativer Weg der Autophagie beschrieben, der unabhängig von den Atg-Proteinen 5 und 7 verläuft. Mäusezellen mit einem Knockout der Gene Atg5 oder Atg7 waren ent-

gegen der Vermutung dazu fähig, Autophagosomen zu bilden und Proteine Autophagie-vermittelt abzubauen [Nishida et al., 2009]. Dies überraschte, da in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, dass die beiden Gene essentiell für die Autophagie sind [Komatsu et al., 2005; Kuma et al., 2004]. Im Gegensatz zu konventioneller Makroautophagie scheinen die Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme sowie das Atg9-System während dieser alternativen Autophagie keine Rolle zu spielen. Auch konnte gezeigt werden, dass alternative Makroautophagie induziert wird, ohne dass LC3-II gebildet wird. Dagegen scheinen die Atg-Gene ULK1 und Beclin1 sowie Fip200 und Vps34 maßgeblich an alternativer Autophagie beteiligt zu sein [Nishida et al., 2009]. In Experimenten von Nishida und Kollegen wurde alternative Autophagie unter anderem durch die Inkubation von MEFs mit dem DNA-schädigenden Agens Etoposid oder durch Hungern induziert. Es wird vermutet, dass konventionelle bzw. alternative Autophagie durch verschiedene Stimuli und abhängig vom Zelltyp induziert werden könnten und potentiell unterschiedliche Funktionen übernehmen [Shimizu et al., 2010]. Welche Bedeutung diesem neuen, als alternative Autophagie bezeichneten Weg zukommt, ist derzeit noch unklar. Die Erkenntnisse, die in anderen Kapiteln dieser Arbeit zur Makroautophagie dargestellt werden, beziehen sich auf die konventionelle Form der Autophagie. Nur wenn es ausdrücklich beschrieben ist, beziehen sie sich auf den alternativen Weg.

1.1.5 Regulation der Autophagie

Zentraler Regulator der Autophagie ist die Serin/Threonin Protein Kinase mammalian target of rapamycin (mTOR). Sie integriert Informationen zahlreicher Signaltransduktionswege und fungiert als Inhibitor der Autophagie. Die Inaktivierung von TOR unter Hungerbedingungen und die damit einhergehende Induktion von Autophagie ist ein von der Hefe bis zu Säugetieren konservierter Prozess [Blommaart et al., 1995]. mTOR besteht aus zwei funktionellen Einheiten, mTor complex 1 und 2 (mTORC1 bzw. mTORC2). Während mTORC2 keine direkte Rolle in der Autophagieregulation spielt, werden über mTORC1 Signale von Wachstumsfaktoren, Aminosäuren, Glukose und Signale über den Energiestatus und andere Formen von Stress vermittelt [Ravikumar et al., 2010; Sarbassov et al., 2005]. Bei guter Nährstofflage hemmt TORC1 den ULK1/ULK2-Atg13-FIP200 Komplex und damit die Autophagie. In Mangelsituationen wird diese Hemmung aufgehoben und Autophagie induziert [Wang and Levine, 2010].

In Anwesenheit von anabolen Hormonen wie Insulin und anderen Wachstumsfaktoren wird die Klasse I Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) durch den aktivierten Tyrosinkinase Rezeptor zur Umwandlung von Phosphatidylinositol 4,5-Phosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol 3,4,5-Phosphat (PIP3) stimuliert. PTEN fungiert hier als negativer Regulator, indem es die Umwandlung zu PIP3 inhibiert. Die vermehrte Synthese von PIP3 bewirkt über eine Aktivierung von Akt¹ die Inhibierung des tuberous sclerosis complex (TSC1/TSC2). Dieser heterodimere Komplex löst durch Stimulation der GTPase Aktivität von Rheb die Umwandlung von Rheb-GTP zu Rheb-GDP aus, wobei Rheb-GTP aktivierend und Rheb-GDP inhibierend auf TORC1 wirken. Die Anwesenheit von Wachs-

¹Proto-Onkogen; Serin/Threonin Kinase, die auch Protein Kinase B (PKB) genannt wird; in Säugerzellen sind drei Isoformen bekannt [Brazil and Hemmings, 2001]

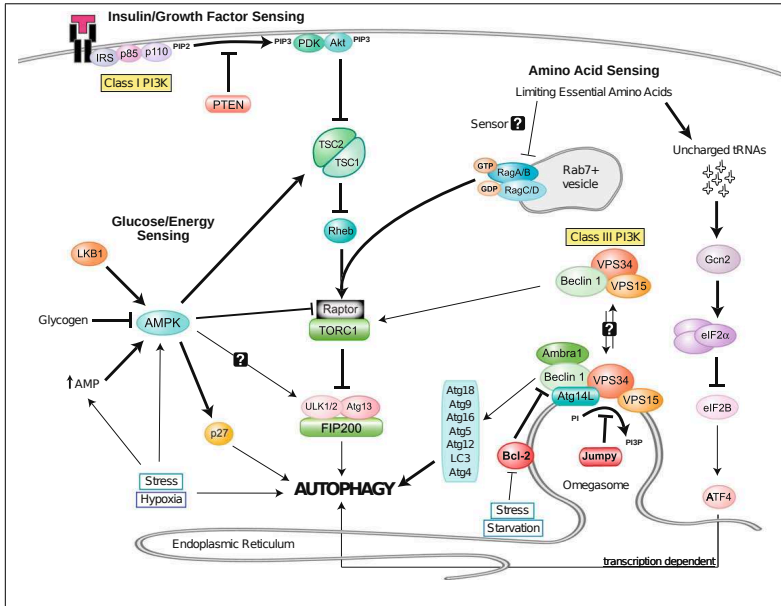


Abbildung 1.5: Regulation der Autophagie über den mTOR Signalweg. Darstellung verschiedener Signaltransduktionswege, die zur Regulation von mTOR und der Autophagie beitragen. Modifiziert nach [Wang and Levine, 2010]

tumsfaktoren wirkt somit auf TORC1 aktivierend, auf die Autophagie wirkt sie inhibierend [Wang and Levine, 2010].

Während der Entzug von Wachstumsfaktoren über den Klasse I PI3K-Signaltransduktionsweg stimulierend auf die Autophagie wirkt, scheinen Aminosäuren über einen alternativen Signalweg auf TORC1 zu wirken. Es hat sich herausgestellt, dass eine maximale TOR-Aktivierung vor allem in Anwesenheit von verzweigtkettigen Aminosäuren wie Leucin erfolgt [Christie et al., 2002]. In einer neueren Studie konnten die sogenannten Rag Proteine identifiziert werden, eine Gruppe von vier kleinen GTPasen, die TORC1 in Abhängigkeit von Aminosäuren aktivieren [Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008]. Als weiteres AS-abhängiges Regulatorprotein konnte Vps34, eine Klasse III Phosphatidylinositol 3-Kinase, identifiziert werden. In Abwesenheit von Aminosäuren fungiert sie als TORC1-Aktivator [Byfield et al., 2005]. Es sind noch weitere Signalkaskaden bekannt, über die der Aminosäure-Status einer Zelle Einfluss auf die Autophagieregulation nehmen kann. Als Beispiel sei der Signalweg über eIF2α erwähnt, der bei niedrigen Aminosäurekonzentrationen durch eine verminderte Beladung von tRNAs eingeleitet wird und zu Änderungen der Transkription führt [Wang and Levine, 2010].

Neben Aminosäure-Mangel wirken noch andere Formen von Nährstoffmangel durch die Inhibition von TORC1 aktivierend auf die Autophagie. Ein zentraler Mechanismus um den Energiestatus

der Zelle zu erfassen erfolgt über AMP-activated protein kinase (AMPK). Niedrige intrazelluläre ATP-Konzentrationen lösen die Aktivierung von AMPK aus. Ein erhöhtes Verhältnis von AMP zu ATP fördert die Bindung von AMP an die regulatorische Untereinheit von AMPK. Dies wiederum ermöglicht die Phosphorylierung und Aktivierung der katalytischen Untereinheit von AMPK durch LBK1. AMPK wiederum phosphoryliert mindestens zwei Proteine, um eine schnelle Suppression der TORC1 Aktivität zu erreichen: den Tumorsuppressor TSC2 und Raptor, den Bindungspartner von TORC1 [Burman and Ktistakis, 2010; Gwinn et al., 2008; Shaw, 2009]. Neue Studien zeigen, dass AMPK zudem ein Bindungspartner von ULK1 ist. Demnach kann AMPK Autophagie direkt über eine Phosphorylierung von ULK1 induzieren [Kim et al., 2011; Lee et al., 2010].

Ein Signalweg, der ebenfalls auf den TSC1/TSC2-Komplex wirkt und Autophagie induzieren kann, läuft über den Ras/Raf-1/MEK/ERK1/2 Signalweg (nicht dargestellt in Abbildung 1.5 auf Seite 9) [Pattingre et al., 2003]. Es ist bekannt, dass Ras unterschiedliche Rollen in der Autophagieregulation übernimmt. Während es über ERK1/2 stimulierend auf die Autophagie wirkt, kann es über den Klasse I PI3K-Signaltransduktionsweg Autophagie inhibieren [Furuta et al., 2004].

p53 reguliert sowohl Autophagie, die durch Stress induziert ist, als auch basale Autophagie [Balaburski et al., 2010]. Es konnte gezeigt werden, dass genotoxischer Stress sowie metabolischer Stress zu einer Aktivierung von p53 führen. Unterliegt die Zelle metabolischem Stress, führt die Aktivierung von AMPK zu einer Phosphorylierung von p53. Aktiviertes p53 leitet dann einen Zellzyklusarrest ein, der es der Zelle ermöglicht, Phasen von Nährstoffmangel zu überleben [Balaburski et al., 2010; Feng et al., 2005; Jones et al., 2005]. Die Aktivierung von p53 durch genotoxischen Stress führt über verschiedene Wege zu einer Inhibition von mTOR und folglich zu einer Induktion der Autophagie. p53 transaktiviert Gene, die für Inhibitoren von mTOR kodieren wie z. B. TSC2 und PTEN. Daneben vermittelt p53 eine Aktivierung von AMPK, das wiederum den mTOR Inhibitor TSC2 stimuliert und zu einer Inaktivierung von mTOR führt [Balaburski et al., 2010; Feng et al., 2005; Maiuri et al., 2010]. Kürzlich konnten zudem die Proteine Sestrin1 und 2 identifiziert werden, die ebenfalls die Aktivität von AMPK steigern [Budanov and Karin, 2008]. Ein weiterer Mechanismus wie p53 Autophagie induzieren kann, ist die Transaktivierung von Genen wie z.B. damage-regulated autophagy modulator (DRAM). DRAM kodiert für ein lysosomales Protein, welches Makroautophagie induzieren kann, das aber ebenso für den durch p53 vermittelten programmierten Zelltod essentiell ist [Crighton et al., 2006, 2007].

Analog zu PTEN, einer Lipidphosphatase, die die Aktivierung des Klasse I PI3K-Signaltransduktionswegs negativ reguliert, indem sie die Umwandlung von PIP2 zu PIP3 hemmt, verhindert Jumpy die durch Vps34 vermittelte Phosphorylierung von PI zu PI3P und wirkt damit inhibierend auf die Autophagie. Die Balance zwischen Bildung von PI3P durch Vps34 und die Hydrolyse durch Jumpy scheint den autophagischen Flux zu regulieren [Vergne and Deretic, 2010; Vergne et al., 2009]. Der Beclin-1 Komplex ist Ziel der Regulation durch c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK-1) und death-associated protein kinase (DAPK). Während Bcl-2 unter Bedingungen einer ausgeglichenen Nährstofflage an Beclin 1 bindet und so dessen Autophagie-induzierende Wirkung unterbindet, bewirkt JNK-1 unter Hungerbedingungen die Phosphorylierung von Bcl-2. Phosphoryliertes Bcl-2 dissoziiert von Beclin-1 und es kommt zur Autophagieinduktion [Wei et al., 2008]. Eine Phospho-

rylierung von Beclin 1 durch DAPK fördert ebenfalls die Dissoziation von Beclin 1 von Bcl-XL und somit die Induktion von Autophagie [Zalckvar et al., 2009].

Neben den genannten Regulatoren der Autophagie sind noch zahlreiche weitere bekannt, von denen einige auch mTOR-unabhängig wirken.

1.1.6 Klinische Bedeutung der Autophagie

Neben der klassischen Aufgabe der Autophagie als Überlebensmechanismus unter Hungerbedingungen, erfüllt sie in Säugetierzellen vielfältige Funktionen. Sie erfüllt zahlreiche Gewebe-spezifische Aufgaben und trägt zur Pathogenese einer Reihe menschlicher Erkrankungen oder zur Reaktion auf solche bei [Mijaljica et al., 2010]. In den letzten Jahren konnte für viele Erkrankungen eine Verbindung zu Autophagie aufgedeckt werden, darunter für Karzinome, neurodegenerative Erkrankungen, Myopathien, Leber- und Herzmuskelerkrankungen sowie für bakterielle und virale Infektionen.

Zu den ersten Erkrankungen, für die ein Zusammenhang zur Autophagie hergestellt werden konnte, zählten verschiedene Karzinomarten. Während sowohl negative als auch positive Effekte der Autophagie auf die Tumorgenese bekannt sind, geht man derzeit davon aus, dass die Funktion der Autophagie als Tumorsuppressor überwiegt [Tschan and Simon, 2010]. Deletionen eines Allels des Atg-Gens Beclin 1 können bei einem großen Teil der nicht hereditären Brust-, Ovarial- und Prostatakarzinome gefunden werden. In einem Mausmodell konnte bei Mäusen, die eine Deletion eines der Allele des Gens Beclin 1 aufwiesen, eine erhöhte Tumoprädisposition nachgewiesen werden. Die für Beclin 1 heterozygoten Mäuse entwickelten vermehrt Lymphome, sowie Karzinome der Leber und der Lunge [Chen and Karantza-Wadsworth, 2009; Yue et al., 2003]. Auch für andere Atg-Gene wie z.B. Atg4c konnten tumorsuppressive Effekte nachgewiesen werden [Mariño et al., 2007] und für einige Tumorsuppressorgene wie death associated protein kinase (DAPK), p53 oder PTEN konnte gezeigt werden, dass sie die Autophagie verstärken [Tschan and Simon, 2010].

Der Mechanismus, wie die Autophagie ihre Aufgabe als Tumorsuppressor erfüllt, konnte noch nicht aufgeklärt werden. Es existieren mehrere Modelle, wie ein Defekt der Autophagie zur Tumorentstehung beitragen könnte. Die Autophagie ist an der Beseitigung beschädigter oder alter Organellen beteiligt und ein Defekt führt zu einer Anhäufung funktionslos gewordener Mitochondrien. Damit verbunden kommt es zur Anhäufung von reactive oxygen species (ROS), die über eine Erhöhung des oxidativen Stresses zu Schäden an der DNA führen können [Jin, 2006]. Darüber hinaus trägt die Autophagie zu einer Form von Zelltod bei, der als Typ II programmierter Zelltod bezeichnet wird und unabhängig vom apoptotischen Zelltod verläuft. Auf diese Weise kann Autophagie die Zellzahl in einem Gewebe mitregulieren [Mijaljica et al., 2010]. Auf der anderen Seite kann Autophagie in fortgeschrittenen Tumorstadien das Überleben von Tumorzellen in einer Umgebung von Nährstoffmangel oder während einer Chemotherapie oder Bestrahlung sichern. Unter diesen Umständen könnte es sinnvoll sein, eine antineoplastische Therapie mit Medikamenten zu kombinieren, die Autophagie hemmen und nicht induzieren. Da die Rolle der Autophagie in der Tumorgenese vom jeweiligen Typ des Tumors abhängt und davon, in welchem Stadium sich die

Krankheit befindet, ist es für therapeutische Strategien von besonderem Interesse, die komplexe Rolle der Autophagie besser zu verstehen [Tschan and Simon, 2010].

In post-mitotischen Zellen wie Neuronen ist der Umsatz von Proteinen und Organellen besonders wichtig für die Zellhomöostase, was durch eine basale Autophagieaktivität erreicht zu werden scheint. Ein Ausfall der Autophagie durch einen Knockout der Gene Atg5 oder Atg7 führt bei Mäusen zu einer Akkumulation von aggregierten Proteinen in Neuronen und zu Neurodegeneration [Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006]. Die Autophagie scheint somit für den Abbau von Proteinaggregaten wichtig zu sein. Es sind einige menschliche Krankheiten bekannt, die mit der Ablagerung fehlgefalteter Proteinaggregate in betroffenen Hirnregionen einhergehen. Zu ihnen gehören der Morbus Parkinson (Akkumulation von α -Synuclein in Form sogenannter Lewy-Körperchen), der Morbus Alzheimer (Ablagerungen von Vorstufen des β -Amyloids in Autophagosomen, die zu groß für den proteasomalen Abbau sind) und der Morbus Huntington (Akkumulation von Huntingtin). Daneben werden auch Erkrankungen der Motoneuronen, wie die Amyotrophe Lateralsklerose, bei der es durch die Degeneration von Motoneuronen zur respiratorischen Insuffizienz und zum Tod kommt, oder die Lafora Krankheit, eine autosomal rezessiv vererbte progressive myoklonale Epilepsie, in Zusammenhang mit einem Defekt der Autophagie gebracht [Menzies et al., 2010]. Es gibt Hinweise dafür, dass Autophagie auch bei akuten neuronalen Schädigungen durch hypoxisch-ischämische Ereignisse eine Rolle spielt, indem sie den neuronalen Zelltod fördert [Koiike et al., 2008]. Außerdem konnte für lysosomale Speicherkrankheiten nachgewiesen werden, dass ein Defekt der Morphogenese oder Funktion von Lysosomen eine Verschmelzung mit Autophagosomen unmöglich macht und auf diese Weise der Abbau des im Autophagosom sequestrierten zytoplasmatischen Materials verhindert wird [Kundu and Thompson, 2008]. Die meisten lysosomalen Speicherkrankheiten manifestieren sich über eine Myopathie oder Kardiomyopathie. Eines der am besten untersuchten Beispiele ist die Danon Erkrankung (Danon's Disease), die mit einer massiven Anhäufung autophagischer Vakuolen in der Herz- und Skelettmuskulatur einhergeht, aber auch der M. Pompe und die X-chromosomal-rezessive Form der myotubulären Myopathie zählen zu den autophagischen, vakuolären Myopathien [Huang and Klionsky, 2007]. Ebenfalls eine muskuläre Erkrankung, die mit Autophagie assoziiert ist, ist die sporadische Einschlusskörpermyositis (sporadic inclusion body myositis). Sie ist die häufigste erworbene Skelettmuskelerkrankung bei Patienten älter als 50 Jahre und ist durch eine intrazelluläre Akkumulation von Proteinaggregaten wie β -Amyloid charakterisiert [Lünemann et al., 2007].

Desweiteren spielt die Autophagie eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung einer normalen kardiovaskulären Funktion und Morphologie [Martinet et al., 2007]. In erwachsenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Atg5 in Kardiomyozyten zur kardialen Hypertrophie, linksventrikulären Dilatation und kontraktile Dysfunktion führt [Nakai et al., 2007]. Die Rolle, die die Autophagie in der Pathogenese von Herzerkrankungen spielt, sowie die Verbindung zwischen Autophagie und Atherosklerose sind aber noch weitgehend unverstanden [De Meyer and Martinet, 2009].

In der Leber trägt die Autophagie zu einem Gleichgewicht des Nährstoff- und Energiestatus bei und übernimmt wichtige Funktionen bei der Entfernung fehlgefalteter Proteine und gealterter Organellen. Eine Fehlfunktion kann zu Entzündung, Leberzirrhose oder hepatozellulärem Karzinom

führen [Yin et al., 2008]. Darüberhinaus scheint die Autophagie wichtig für die Funktion und Struktur der β -Zellen des Pankreas zu sein, so dass eine verminderte Autophagie zu geringerer Insulinproduktion führen könnte [Mijaljica et al., 2010].

Es wird vermutet, dass Autophagie in Zellen der Lunge als Antwort auf eine Schädigung durch unterschiedlichste Stressoren wie Oxidantien, Hypoxie, Entzündung, Ischämie, Luftverschmutzung oder Zigarettenrauch aktiviert wird. In Lungen von Mäusen konnte nach chronischer Exposition mit Zigarettenrauch eine erhöhte Rate an Autophagie festgestellt werden. Außerdem konnten in Lungen von Patienten mit chronic obstructive pulmonary disease (COPD) erhöhte morphologische und biochemische Marker für Autophagie nachgewiesen werden, was einen Zusammenhang zwischen Autophagie und COPD vermuten lässt [Ryder et al., 2010].

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Autophagie diverse Funktionen des Immunsystems beeinflusst. Autophagie fungiert als wichtiger Abwehrmechanismus gegen bakterielle Pathogene. Besonders wichtig scheint sie für die Abwehr von Bakterien zu sein, die eine intrazelluläre Nische zum Überleben nutzen, indem sie sich in der Zelle replizieren und so der Abwehr des angeborenen Immunsystems (z. B. dem Komplementsystem) entgehen können [Kundu and Thompson, 2008; Radtke and O’Riordan, 2006]. Die Sequestrierung intrazellulärer Pathogene während der Autophagie ist aber nicht auf Bakterien und Parasiten beschränkt. In Versuchen mit dem Herpes simplex Virus Typ I konnte die Rolle der Autophagie in der Viruseliminierung bestätigt werden. Es ist zu erwähnen, dass einige Pathogene Mechanismen entwickelt haben, mit denen sie der immunologischen Abwehr durch Autophagie entgehen können. Damit haben sie eine replikative Nische entdeckt. Neben der Bedeutung für die angeborene Immunität unterstützt Autophagie auch die erworbene Immunantwort. Sie unterstützt sowohl die Präsentation von Antigenen durch MHC Klasse II als auch durch MHC Klasse I Moleküle [Yang and Klionsky, 2010a]. Schließlich kann Autophagie möglicherweise entzündliche und Autoimmunerkrankungen verhindern. Beispielsweise gibt es Hinweise dafür, dass eine Fehlregulation der Autophagie zur Pathogenese des M. Crohn beitragen könnte [Mizushima et al., 2008].

1.2 Transkriptionsfaktor Miz1

Myc-interacting zinc finger protein (Miz1) ist ein Transkriptionsfaktor, der in einem Yeast-two-hybrid-screen als c-Myc bindendes Protein identifiziert wurde [Peukert et al., 1997]. Murines Miz1 besteht aus 794 Aminosäuren und weist eine 92%ige Homologie zu humanem Miz1 auf, das aus 803 Aminosäuren besteht [Kelly and Daniel, 2006; Peukert et al., 1997]. Miz1 gehört zur BTB/POZ-Familie der Zinkfingerproteine [Peukert et al., 1997], deren Name auf eine am N-terminalen Ende lokalisierten BTB/POZ-Domäne (Bric à brac, Tramtrack, Broad complex/Poxvirus and Zinc Finger) zurückzuführen ist. Diese konservierte POZ-Domäne, die in den meisten Proteinen aus 120 AS besteht, konnte in Zinkfingerproteinen und in Poxvirus-Proteinen nachgewiesen werden. In den meisten Proteinen vermittelt die POZ-Domäne Protein-Protein-Interaktionen [Bardwell and Treisman, 1994].

In Miz1 erfüllt die POZ-Domäne eine transkriptionelle Effektorfunktion, unter anderem indem sie die Rekrutierung von Kofaktoren an die DNA vermittelt. Für die transkriptionelle Aktivierung

von Zielgenen und Vermittlung der wachstumshemmenden Wirkung von Miz1 ist die POZ-Domäne essentiell [Herold et al., 2002]. Zusätzlich wird auch bei Miz1 die Interaktion mit anderen Proteinen über die POZ-Domäne ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Homodimerisierung zweier Miz1-Moleküle über die POZ-Domäne erfolgt. Auch die Bindung von Partnern, die keine POZ-Domäne enthalten, wird auf diese Weise vermittelt [Stead et al., 2007; Stogios et al., 2010]. Stead und Kollegen gehen von einem Modell aus, nach dem die Bildung von Homo- und Heterodimeren über eine Interaktion der α -Helices erfolgt, während eine Tetramerisierung durch Assoziation der β -Faltblätter eingeleitet wird [Stead et al., 2007]. Stogios und Kollegen dagegen postulieren, dass Miz1 überwiegend als Dimer vorliegt und dass, falls eine Tetramerisierung der Miz1-Moleküle erfolgt, diese Assoziation sehr schwach ausgeprägt ist [Stogios et al., 2010].

Die meisten BTB/POZ-Domäne Proteine sind im Zellkern lokalisiert [Bardwell and Treisman, 1994], Miz1 ist dagegen auch im Zytosol zu finden. In Abwesenheit von Myc akkumulieren sowohl endogenes als auch transfizierte Formen von Miz1 im Zytosol [Peukert et al., 1997]. Zum Teil liegt Miz1 im Zytosol an Mikrotubuli gebunden vor [Ziegelbauer et al., 2001, 2004]. Es besitzt keine Kernlokalisationssequenz, so dass der Import in den Nucleus und damit die Regulation der Konzentration von Miz1 im Nucleus durch andere kernlokalisierte Proteine wie p300 und c-Myc vermittelt wird. Auch für diesen Prozess ist die POZ-Domäne essentiell [Peukert et al., 1997; Staller et al., 2001]. Am C-terminalen Ende setzt sich Miz1 aus dreizehn Zinkfingern des Typs Cys-2-His-2 zusammen, die eine DNA-Bindung ermöglichen [Seoane et al., 2002].



Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors Miz1. POZ: POZ-Domäne; ZF: Zinkfingerdomäne

1.2.1 Funktion von Miz1

Miz1 kann Gene transkriptionell aktivieren und reprimieren. Die transkriptionelle Aktivierung erfolgt, indem es über seine Zinkfinger an sogenannte Initiatorelemente (INR) der DNA, die als Startpunkte der DNA-Transkription fungieren, bindet [Smale and Baltimore, 1989]. Hierbei wird p300 von Miz1 rekrutiert und wirkt als Koaktivator [Staller et al., 2001]. Zu den Genen, die direkt durch Miz1 transkriptionell aktiviert werden, zählen *p15Ink4b*, *p21Cip1* und *Mad4* [Herold et al., 2002; Kime and Wright, 2003; Seoane et al., 2002; Staller et al., 2001]. Durch die transkriptionelle Aktivierung von wachstumshemmenden Genen übt Miz1 einen starken Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation aus. Es trägt essentiell zum Wachstumsarrest von Zellen bei, indem es Gene aktiviert, die zum Zellzyklusarrest beitragen [Herold et al., 2002; Peukert et al., 1997; Staller et al., 2001].

Ein Mechanismus, über den Miz1 Zellproliferation inhibiert, ist die Induktion der Transkription des *p15Ink4b* Gens, das für einen cyclin-dependent kinase (Cdk) Inhibitor kodiert [Staller et al., 2001]. Experimente mit Deletionsmutanten, die keine POZ-Domäne aufwiesen, zeigten, dass die

POZ-Domäne für die transkriptionelle Aktivierung benötigt wird [Herold et al., 2002]. Miz1 bindet an das Initiatorelement des *p15Ink4b* Promotors und kann in Kooperation mit den Proteinen Smad3 und 4, die an eine Region oberhalb des *p15Ink4b* Promotors binden, die Transkription starten [Seoane et al., 2001]. Transforming growth factor- β (TGF β) fördert die Aktivierung des Promotors von *p15Ink4b*. Zum Einen aktiviert es die Proteine Smad3 und 4 und zum anderen befreit es Miz1 aus seiner hemmenden Bindung mit Myc, indem es die Expression von Myc reprimiert [Adhikary and Eilers, 2005].

Desweiteren wird Miz1 für die transkriptionelle Aktivierung des Gens *p21Cip1* benötigt [Herold et al., 2002]. Das Gen kodiert für einen Cdk Inhibitor, der neben der Regulation des Zellzyklus noch weitere Funktionen erfüllt z. B. bei der Apoptose, der transkriptionellen Regulation, der Zellmigration und der Zelldifferenzierung [Besson et al., 2008]. Unter UV-Strahlung wird Miz1 aus einer hemmenden Bindung mit topoisomerase II binding protein (TopBP1) gelöst und bindet an den Promotor von *p21Cip1*. Zur Induktion der Transkription wird zusätzlich p53 benötigt [Herold et al., 2002].

Miz1 übernimmt wichtige Funktionen in der Zelldifferenzierung, der Zelladhäsion sowie im Zellmetabolismus [Bowen et al., 2002; Gebhardt et al., 2006, 2007; van de Wetering et al., 2002; Ziegelbauer et al., 2001]. Gebhardt et al. konnten zeigen, dass Miz1 im Stratum basale der Epidermis von Mäusen stark exprimiert wird und dass zahlreiche Gene, die zur Zelladhäsion der Keratinozyten beitragen, durch den Komplex aus Myc und Miz1 reguliert werden. Durch Versuche mit der Myc Mutanten MycV394D, die nicht mehr an Miz1 bindet, aber die transaktivierenden Eigenschaften noch hat [Herold et al., 2002], konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Myc an Miz1 für die Repression von *p15Ink4b* in primären murinen Keratinozyten wichtig ist. Nur in Zellen, die Wildtyp-Myc und nicht in Zellen die MycV394D exprimierten, war eine verminderte Adhäsion und vermehrte Proliferation der Keratinozyten zu beobachten. Myc reguliert somit die Keratinozyten-Adhäsion durch eine Bindung an Miz1. Der Komplex aus Myc und Miz1 reguliert die Wirkung von TGF β auf Keratinozyten [Gebhardt et al., 2006]. Weiterhin konnte herausgefunden werden, dass Miz1 eine Rolle für die Kontrolle von Proliferation und Differenzierung von Haarfollikeln spielt [Gebhardt et al., 2007]. Die POZ-Domäne von Miz1 erfüllt außerdem eine wichtige Funktion für die durch TGF β gesteuerte Katagenphase des Haarzellzyklus. In älteren Mäusen, in denen die POZ-Domäne von Miz1 ausgeschaltet war, konnte zudem eine verminderte Anzahl von Haaren sowie eine veränderte Pigmentierung der Haut festgestellt werden [Gebhardt et al., 2007]. An konstitutiven *Miz1*-Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass Miz1 essentiell für die embryonale Entwicklung ist. Miz1 wird während der embryonalen Entwicklung von Mäusen ubiquitär exprimiert. Eine starke Apoptose ektodermaler Zellen führt bei homozygoten *Miz1*-Knockout Mäusen am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung zum Absterben der Mausembryonen [Adhikary et al., 2003].

1.2.2 Interaktionspartner von Miz1

In den letzten Jahren konnten einige Interaktionspartner von Miz1 identifiziert werden, die auf unterschiedliche Weise mit Miz1 interagieren. Zu den Proteinen, die die Aktivität von Miz1 för-

dern oder synergistisch wirken, zählen p300 sowie Smad3 und 4, während Myc, TopBP1, 14-3-3 η , BCL6, HCF-1, Zbtb4 und Gfi-1 Miz1 negativ regulieren (Quellen in der folgenden Auflistung).

c-Myc ist ein Protoonkogen und wirkt als zentraler Regulator der Zellproliferation und des Zellwachstums. Es ist mit der Entstehung zahlreicher Tumore assoziiert. Zusammen mit den verwandten Genen *n-Myc*, *l-Myc*, *s-Myc* und *b-Myc* gehört es zur *Myc* Genfamilie [Adhikary and Eilers, 2005]. Es wurde als zelluläres Homolog des viralen Onkogens *v-Myc* entdeckt [Rousset et al., 1979] und kodiert für das Protein Myc, das als Transkriptionsfaktor wirkt. Myc bindet als Teil eines heterodimeren Komplexes mit Max an CAC(A/G)TG Sequenzen der DNA, sogenannte E-boxes, und bewirkt eine Aktivierung der Transkription [Adhikary and Eilers, 2005]. Zusätzlich kann Myc zur Repression von Genen beitragen, indem es - im Komplex mit Max - über seine basische helix-loop-helix Domäne an Miz1 bindet. Auf diese Weise kann Myc die Transaktivierung von Miz1 inhibieren und die wachstumshemmende Wirkung von Miz1 aufheben [Peukert et al., 1997]. Myc besitzt somit mindestens zwei unterschiedliche biochemische Eigenschaften - die Fähigkeit zur Aktivierung durch Max und die Fähigkeit zur Repression durch Miz1 [Herold et al., 2002]. Peukert et al. konnten zeigen, dass für die Inhibierung der Funktion von Miz1 durch Myc die Integrität der POZ-Domäne essentiell ist [Peukert et al., 1997]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass für die transkriptionelle Repression durch Myc die Bindung von Myc an Miz1 notwendig ist. Um dies zu beweisen, wurden Mutanten von Myc generiert (MycV394D), die nicht mehr an Miz1, aber weiterhin an Max binden können. MycV394D Mutanten waren unfähig Miz1-abhängige Transkription zu hemmen, wohingegen die Fähigkeit E-Box-abhängige Genexpression zu induzieren nicht beeinträchtigt war [Herold et al., 2002].

Eine charakteristische Eigenschaft von Zellen mit gestörter Myc Regulation ist ihre Unfähigkeit, auf anti-mitogene Signale zu reagieren. Die Ursache hierfür kann eine durch Myc ausgelöste Repression der Transkription von Cdk-Inhibitoren sein [Herold et al., 2002]. Die Gene *p15Ink4b*, *p21Cip1* und der Myc-Antagonist *Mad4*, die für Proteine kodieren, die den Zellzyklus inhibieren, werden durch eine Interaktion von Myc mit Miz1 reprimiert [Wanzel et al., 2003]. So verhindert Myc die Miz1-abhängige Transkription von *p15Ink4b* und verhindert auf diese Weise einen durch TGF β ausgelösten Arrest der Zellproliferation. Dies geschieht unter anderem, indem Myc mit p300 um die Bindung an Miz1 konkurriert. Lediglich an p300 gebundenes Miz1 kann in Kooperation mit den Proteinen Smad3 und 4 an das Initiatorelement des *p15Ink4b* Promotors binden und die Transkription des Cdk Inhibitors p15INK4b starten. Auf der anderen Seite kann TGF β die Inhibition durch Myc abschwächen, da es die Expression von Myc reprimiert und auf diese Weise Miz1 aus seinem Komplex mit Myc löst [Seoane et al., 2001; Staller et al., 2001]. Auf ähnliche Weise wie Myc die Wirkung von TGF- β abschwächt, verhindert es auch die durch Miz1 vermittelte zelluläre Antwort auf UV-Strahlung. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht wird Miz1 aus der hemmenden Bindung mit topoisomerase II binding protein (TopBP1) losgelöst und bewirkt in Zusammenarbeit mit p53 die transkriptionelle Aktivierung von *p21Cip1*. Die Bindung von Myc an Miz1 verhindert die Induktion von *p21Cip1* und damit den durch UV-Strahlung ausgelösten Zellzyklusarrest

[Herold et al., 2002; Seoane et al., 2002].

Während Miz1 an der Regulation der zellulären Antwort auf UV-Strahlung sowie auf anti-mitogene Signale wie TGF- β beteiligt ist und als Antwort auf diese die Zellproliferation inhibiert, bewirkt Myc eine Repression der von Miz1 aktivierten Gene. Miz1 spielt somit eine Schlüsselrolle in der Umsetzung der transkriptionellen Repression von Myc. Es vermittelt die inhibierende Wirkung von Myc auf den durch unterschiedliche Faktoren ausgelösten Zellzyklusarrest [Wanzel et al., 2003].

TopBP1 ist an der Antwort auf DNA-Schäden und an der DNA-Replikation beteiligt [Garcia et al., 2005; Mäkinen et al., 2001]. Es verhindert die Transaktivierung von *p15Ink4b* und *p21Cip1* durch die Interaktion mit der POZ-Domäne von Miz1. Durch UV-Strahlung wird die Verbindung von Miz1 und TopBP1 gelöst [Herold et al., 2002]. Miz1 ermöglicht die Bindung von TopBP1 an das Chromatin und verhindert dessen Abbau durch die Ubiquitin-Ligase HectH9 [Herold et al., 2008].

Smad3 und 4 Smad-Proteine wirken in der TGF β Signalkaskade und werden direkt vom TGF β Rezeptor aktiviert. Durch TGF β induzierte Smad-Proteine binden oberhalb des *p15Ink4b* Promotors und bewirken die transkriptionelle Aktivierung, indem sie mit Miz1 interagieren [Seoane et al., 2001].

Histonacetyltransferase p300 trägt als Koaktivator von Miz1 zur transkriptionellen Aktivierung von *p15Ink4b* bei. Es ist an der Translokation von Miz1 in den Zellkern beteiligt [Staller et al., 2001].

Nucleophosmin ist ein Koaktivator von Miz1 und fördert die Miz1-abhängige Transaktivierung der Miz1-Zielgene. Miz1 und Nucleophosmin regulieren den p53-unabhängigen Zellzyklusarrest [Wanzel et al., 2008].

14-3-3 η inhibiert die Funktion von Miz1, indem es mit dessen DNA-Bindungs-Domäne interagiert. Miz1 wird von Akt an der Aminosäure Serin 428 phosphoryliert und kann in dieser Form an 14-3-3 η binden. Akt verstärkt somit die inhibitorischen Effekte von 14-3-3 η auf Miz1. Die Bindung von 14-3-3 η an Miz1 verhindert die Interaktion von Miz1 mit einigen seiner Zielgene, wodurch der Zellzyklusarrest überwunden werden kann und die Erholung von Zellen nach DNA-Schäden gefördert wird. Der Komplex aus Miz1 und 14-3-3 η wirkt als transkriptioneller Repressor [Wanzel et al., 2005].

Bcl6 ist ein Protoonkogen, das für ein auf die Transkription inhibierend wirkendes Protein kodiert. Das Protein BCL6 bindet direkt an spezifische DNA-Sequenzen und supprimiert die Transkription von Zielgenen. Zusätzlich kann es die Transkription von Genen kontrollieren, die keine Bindungsstelle für BCL6 aufweisen, indem es mit Miz1 interagiert. BCL6 kann z. B. über Miz1 an den Promotor des Gens *Cdkn1a* binden und die Expression des Cdk Inhibitors p21 hemmen [Phan et al., 2005].

HectH9 Die E3 Ubiquitin Ligase HectH9 kann Myc an seinem Carboxy-terminalen Ende ubiquitinieren, wodurch die Rekrutierung des Koaktivators p300 gefördert und die Transaktivierung

1 Einleitung

zahlreicher Zielgene von Myc induziert wird. Es wird vermutet, dass HectH9 auf diese Weise zu einem Wechsel zwischen einer aktivierenden und reprimierenden Funktion von Myc beiträgt. Miz1 kann über seine POZ-Domäne an HectH9 binden und die Ubiquitinierung von Myc verhindern. Miz1 und Myc konkurrieren um die Bindung an HectH9 [Adhikary et al., 2005].

SB Transposase Die Sleeping Beauty (SB) Transposase kann DNA Elemente versetzen. Sie interagiert mit Miz1 und reprimiert die Genexpression von Cyclin D1. Vermindertes Cyclin D1 führt zu einer Verlängerung der G1-Phase des Zellzyklus, was eine Transposition begünstigt. Die Verlängerung der G1-Phase ist ebenfalls abhängig von der Interaktion mit Miz1 [Walisko et al., 2006].

Human Host Cell Factor-1 (HCF-1) ist essentiell für die Zellzyklusprogression. Es interagiert mit zwei getrennten Regionen auf dem Miz1 Protein, der N-terminalen POZ-Domäne und einer C-terminal gelegenen Region. Es verhindert die Rekrutierung von p300 durch Miz1 und inhibiert so die transkriptionelle Aktivierung von *p15Ink4b*. HCF-1 scheint somit eine gegensätzliche Rolle zu Miz1 in der Kontrolle des Zellzyklus zu übernehmen [Piluso et al., 2002].

Zbtb4 ist ein POZ/BTB-Domäne Zinkfingerprotein und wirkt als transkriptioneller Repressor. Es assoziiert mit einer Histondeacetylase und bewirkt zusammen mit Miz1 eine Repression von *p21Cip1*. Auf diese Weise inhibiert Zbtb4 einen durch p53 induzierten Zellzyklusarrest. Die Depletion von Zbtb4 führt in der Zellkultur zu einer Hemmung von Apoptose und Zunahme von Zellzyklusarrest und langfristigem Überleben der Zellen als Antwort auf eine Aktivierung durch p53 [Weber et al., 2008].

ARF (Alternate reading frame) siehe Kapitel 1.2.3

Gfi-1 Zinc-finger transcriptional repressor growth factor independence 1 (Gfi-1) fungiert als Onkoprotein und kooperiert mit c-Myc in der Genese von Lymphomen. Es kann die Transkription von Genen reprimieren, indem es direkt an den Promotor seiner Zielgene bindet. Darüber hinaus existiert ein alternativer Weg, über den Gfi-1 Gene reprimieren kann, ohne direkt an die DNA zu binden. Dies geschieht über eine Interaktion mit Miz1. Gfi-1 bindet zusammen mit c-Myc an Miz1 und bildet einen aus drei Teilen bestehenden Komplex, der die Transaktivierung von *Cdkn1a*, das für das Protein p21CIP1 kodiert, und *Cdkn2b*, das für das Protein p15INK4b kodiert, hemmen kann [Basu et al., 2009; Liu et al., 2010].

1.2.3 Interaktion von Miz1 mit ARF, p53 und Myc und der Einfluss auf die Autophagie

p19^{ARF} ist ein Tumorsuppressor, der vom alternierenden Leserahmen des *Ink4a/Arf* Lokus kodiert wird. Gleichzeitig kodiert dieser Genlokus für den Zellzyklusinhibitor p16INK4a [Quelle et al., 1995]. ARF steht für „Alternate Reading Frame“ und wird in Mäusezellen als p19^{ARF} und in

1 Einleitung

menschlichen Zellen als p14^{ARF} bezeichnet. ARF inhibiert als Antwort auf hyperproliferative, onkogene Stimuli wie z. B. Myc oder Ras Zellwachstum, führt zur Zellalterung oder fördert Apoptose. Dies geschieht vor allem über eine Stabilisierung und Aktivierung von p53 [Miao et al., 2010]. p19^{ARF} vermindert die Aktivität der Ubiquitin Ligase Mdm2, die einen hemmenden Einfluss auf p53 ausübt. Auf diese Weise fördert p19^{ARF} durch Stabilisierung von p53 Zellzyklusarrest und Apoptose [Honda and Yasuda, 1999; Pomerantz et al., 1998].

Generell können zwei verschiedene Isoformen von ARF unterschieden werden. p19^{ARF} ist die lange Isoform von ARF und im Nukleolus lokalisiert. Der kurzen Isoform, short mitochondrial ARF (smARF), fehlt die N-terminale Domäne. Sie ist vorwiegend im Mitochondrium zu finden [Reef et al., 2006]. Es existieren verschiedene Theorien, auf welche Art und Weise ARF Autophagie induzieren kann. Pimkina und Kollegen konnten zeigen, dass ARF mit dem Bcl2 Familienmitglied Bcl-xl interagieren und es an der Assoziation mit dem Beclin-1 Komplex hindern kann. Auf diese Weise löst ARF Beclin-1 aus der hemmenden Bindung mit Bcl-xl und ermöglicht die durch Beclin-1/Vps34 vermittelte Autophagie [Pimkina et al., 2009]. Abida und Kollegen postulieren, dass sowohl ein p53-abhängiger wie auch ein p53-unabhängiger Weg existieren, auf dem die lange Form von ARF Autophagie induzieren kann [Abida and Gu, 2008]. Reef und Kollegen kommen dagegen zu dem Schluss, dass ausschließlich die mitochondriale Isoform smARF in der Lage ist, p53-unabhängig Autophagie zu induzieren. Das nukleolär lokalisierte p19^{ARF} benötigt p53 für die Autophagieinduktion, so dass unabhängig von p53 keine Autophagie durch p19^{ARF} möglich ist [Reef and Kimchi, 2008]. Zum Einen wirkt durch ARF vermittelte Autophagie zytotoxisch auf Tumorzellen, zum Anderen kann sie zum Überleben und zum Wachstum von Tumorzellen beitragen [Pimkina and Murphy, 2009]. So konnte durch einen Knockdown von *Arf* in B-Lymphomzellen ein vermindertes Tumorstadium bei ebenfalls reduzierter Autophagie nachgewiesen werden [Humbey et al., 2008]. Dies ist als Hinweis für die zytoprotektive Rolle von ARF und Autophagie zu sehen. Den Tumorzellen wird in diesem Fall das Überleben ermöglicht. Bei vielen anderen Tumoren scheint die durch ARF vermittelte Autophagie hingegen keine zytoprotektive Wirkung zu haben, wie in Sarkomzellen mit *p53* Knockout gezeigt werden konnte [Balaburski et al., 2010]. In diesen Zellen führte ein Knockdown von *Arf* zu einem verstärkten Tumorstadium [Pimkina and Murphy, 2009]. Generell ist die Rolle von ARF auf das Tumorstadium komplex.

Unter physiologischen Bedingungen wird ARF nicht exprimiert [Zindy et al., 2003]. Wird seine Expression dagegen durch onkogene Stimuli induziert, kann ARF einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase auslösen oder Apoptose induzieren [Herkert et al., 2010; Kamijo et al., 1997]. Herkert und Kollegen konnten zeigen, dass ARF im Komplex mit Myc und Miz1 einen entscheidenden Faktor für die Einleitung der Apoptose darstellt [Herkert et al., 2010]. Die Funktion von Myc für die Einleitung von Apoptose nach einer Induktion von p53 war bereits bekannt. Die Stimulation von p53 kann zum Einen einen Zellzyklusarrest bewirken oder aber Apoptose induzieren. Der zytostatische Effekt von p53 wird dabei durch eine transkriptionelle Aktivierung des Cdk Inhibitors *p21Cip1* in Kooperation mit Miz1 ausgelöst, wohingegen Apoptose durch die transkriptionelle Aktivierung von Genen wie *Puma* und *Pig3* vermittelt wird. Indem Myc die transkriptionelle Aktivierung von *p21Cip1* hemmt, trägt es wesentlich zur Initiation der Apoptose bei. Da es zu einer verminderten Expression des Proteins p21CIP1 kommt, wird dessen inhibitorische Wirkung auf den Zellzyklus

abgeschwächt. Die Expressionen der ebenfalls von p53 aktivierten Gene *Puma* und *Pig3*, die fördernd auf die Apoptose wirken, werden dagegen weiterhin induziert. Zudem wirkt Myc auf den Apoptose-Signalweg stimulierend, indem es durch verminderte Expression von p21CIP1 den hemmenden Einfluss dieses Proteins auf Schritte, die p53 und PUMA nachgeschaltet sind, abschwächt [Seoane et al., 2002].

Herkert und Kollegen [Herkert et al., 2010] beschäftigten sich mit der Frage, welche Rolle ARF bei der Entscheidung zwischen Zellarrest und Apoptose einnimmt. Sie konnten feststellen, dass in p53 exprimierenden Zellen ein Arrest in der G1 Phase des Zellzyklus ausgelöst wird, wenn die Expression von ARF induziert wird. Dagegen konnte bei zusätzlicher Expression von Miz1 ein deutlicher Anstieg der Apoptosemarker festgestellt werden. Bei weiterer Aufklärung des Mechanismus konnte gezeigt werden, dass für die Initiation der Apoptose durch ARF der Myc-Miz1 Komplex essentiell ist. Demnach erleichtert ARF die Bindung von Myc an Miz1 und verdrängt NPM, den Koaktivator von Miz1, aus dessen Bindung mit Miz1. Als nächstes bewirkt ARF eine Sumoylierung von Miz1, die allerdings nur stattfindet, wenn Miz1 in einem Komplex mit Myc vorliegt. Herkert und Kollegen spekulieren, dass die Sumoylierung von Miz1 die Genrepression durch den Myc-Miz1 Komplex unterstützt. Das heißt, ARF fördert die transkriptionelle Repression durch den Myc-Miz1 Komplex. Die Gene, die durch diesen Komplex reprimiert werden, kodieren entweder für Proteine, die an der Zelladhäsion beteiligt sind oder für Korezeptoren der Signaltransduktion. Dementsprechend konnte in Zellen, die Miz1 und ARF gleichzeitig exprimieren und in denen Miz1 und Myc interagieren können, eine Aufhebung der Zelladhäsion beobachtet werden. Herkert und Kollegen kommen zu dem Ergebnis, dass ARF die durch Myc-Miz1 vermittelte Repression von Genen der Zelladhäsion unterstützt und auf diese Weise Apoptose induziert [Herkert et al., 2010]. Miao und Kollegen präsentierten dagegen einen anderen noch umstrittenen Erklärungsansatz, um die proapoptotische Funktion von ARF zu erklären. Die durch p53 vermittelte Gentranskription von *Puma* und *Bax* kann demnach von Miz1 gehemmt werden, indem Miz1 die DNA-Bindungsfähigkeit von p53 inhibiert. ARF kann die von Miz1 ausgeübte Suppression auf p53 aufheben, indem es direkt an Miz1 bindet, und kann somit die apoptotische Wirkung von Puma und Bax wiederherstellen. p53 und ARF konkurrieren um die Bindung an Miz1, wobei Miz1 mit beiden Proteinen über seine Zinkfingerdomäne interagiert [Miao et al., 2010].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In Vorarbeiten wurde herausgefunden, dass es Unterschiede bezüglich des lysosomal-autophagischen Kompartiments zwischen Wildtyp- und Miz1 POZ-Domäne Knockout mouse embryonic fibroblasts (MEFs) auf morphologischer und auf Genexpressionsebene gibt. Diese konnten in nach dem 3T3 Protokoll immortalisierten MEFs (3T3 MEFs) und zum Teil in mittels p19^{ARF} shRNA immortalisierten MEFs (MEFs^{ARF}) nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Transkriptionsfaktors Miz1 auf die Regulation des Autophagieprozesses in Fibroblasten zu untersuchen. Es sollte gezeigt werden, ob Miz1 einen sichtbaren Effekt auf die Autophagie ausübt und an welchen Teilschritten der Autophagie es beteiligt ist. Hierfür sollten Genexpressionsmessungen sowie morphologische Untersuchungen in Wildtyp

1 Einleitung

und in Δ POZ-Knockout Zellen, Zellen, bei denen die POZ-Domäne von Miz1 durch einen Knock-out des N-terminalen Bereichs von Miz1 ausgeschaltet worden war, durchgeführt werden. Für die Messungen standen embryonale Mausfibroblasten zur Verfügung, die auf unterschiedliche Weise immortalisiert wurden. Wie bei den vorangegangenen Untersuchungen handelte es sich um 3T3 MEFs und MEFs^{ARF}.

Für den Vergleich der aus unterschiedlichen Zelllinien gewonnenen Ergebnisse, sollte in einem Substitutionsexperiment ein Expressionsvektor für humanes Miz1 auf Δ POZ-Knockout Zellen übertragen werden. Um dies zu erreichen, wurde durch eine Infektion von Δ POZ-Knockout Zellen mit einem pBABE-Miz1 Retrovirus die POZ-Domäne in die Zellen reintegriert. Um zu untersuchen, ob die Substitution der POZ-Domäne Veränderungen der Autophagie bewirkt, sollten die Resultate mit den in den Wildtyp- und Δ POZ-Knockout Zellen beobachteten Veränderungen verglichen werden.

Bisherige Ergebnisse basierten auf semiquantitativen RT-PCRs und konnten bereits Unterschiede in den Expressionen einiger Autophagie-assoziiierter Gene in Wildtyp und Δ POZ-Knockout MEFs zeigen. Diese Untersuchungen sollten mit einer quantitativen PCR-Methode reproduziert und auf weitere Gene ausgedehnt werden. Hierfür sollten die Genexpressionen von 17 Autophagie-assoziierten Genen und von Myc in einer qPCR untersucht werden. Der Einfluss des Transkriptionsfaktors Miz1 auf die Genexpression während basaler oder stimulierter Autophagie sollte durch Untersuchungen in Wildtyp- und Δ POZ-Knockout Zellen vor und nach Stimulation mit EBSS analysiert werden.

Die Ergebnisse sollten mit Hilfe einer zweiten Methode, dem RNase Protection Assay, verifiziert werden. Dies ist ein Nukleotidhybridisierungsverfahren, mit dem die Expression von Genen untersucht werden kann. Mit Hilfe spezifischer Sonden sollten RNA-Sequenzen elf Autophagie-relevanter Gene, deren Expression bereits mittels qPCR untersucht worden war, detektiert und quantifiziert werden.

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand darin, morphologische Unterschiede zwischen Δ POZ- und Wildtyp MEFs anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen herauszuarbeiten. Die Rolle von Miz1 für die Morphologie autophagischer Prozesse sollte in Δ POZ-Knockout MEFs untersucht werden, die entweder mit einem Leervektor oder einem Expressionsvektor für humanes Miz1 infiziert wurden. Um die Unterschiede während basaler Autophagie zu beleuchten, sollten die Zellen mit DMEM inkubiert werden, während die Änderungen im Zustand stimulierter Autophagie durch eine Inkubation der Zellen mit EBSS ermittelt werden sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Zentrifugen	Kühlzentrifuge 3K30 Kühlzentrifuge Alegra™ X-22R Kühlzentrifuge J2-21 Kühlzentrifuge J6 Tischzentrifuge Biofuge pico	Sigma, Deisenhofen Beckman, USA Beckman, USA Beckman, USA Heraeus, Düsseldorf
Mikroskope	Phasenkontrastmikroskop Zeiss IM 35 Transmissionselektronenmikroskop EM 109	Zeiss, Jena Zeiss, Jena
Photometer	U-2000 Spectrophotometer Hitachi	Colora, Lorch
qRT-PCR-Gerät	Mx 3000P™	Stratagene, Heidelberg
Thermocycler	Personal Cycler UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Vortexer	Vibrofix VF1 Electronic	IKA, Staufen
Magnetrührer	Typ Heidolph MR 2000	MAGV GmbH, Rabenau
Wasserbad	Kochwasserbad	Memmert, Rabenau-Londorf
Netzgeräte	2301 Macrodrive 1 Power Supply 2197 Power Supply Power Pack P25	LKB Bromma, Schweden LKB Bromma, Schweden Biometra, Göttingen
Blotkammer	SDE-Elektoblotting System	Peqlab, Erlangen
Inkubatoren	CO ₂ -begasbarer Brutschrank für Zellkultur Brutschrank für Bakterienkultur Schüttelinkubator für Bakterienkultur	Integra, Fernwald Memmert, Rabenau-Londorf New Brunswick Scientific, USA
Autoklaven	GTA 50 Laborautoklav GLA 40-1	Gössner, Hamburg Gössner, Hamburg
Sterilbank	NuAire DH Alphaflow	Integra, Fernwald
Reinstwasseranlage	Clear	Millipore, Eschborn
UV- Transilluminator	CN6 1.4 Raytest	
Kamera	Digitalkamera COOLPIX 5000	Nikon, Düsseldorf
Mikrowelle	800 Watt	Privileg

Tabelle 2.1: Häufig verwendete Geräte

2.1.2 Plastik- und Glaswaren

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Plastikwaren von den Firmen Greiner (Frickenhäusen), Nunc (USA), Sarstedt (Nümbrecht) und Falcon-BD Biosciences (Heidelberg) bezogen. 0,2–2 ml Reaktionsgefäße stammten von der Firma Eppendorf (Hamburg). In der Zellkultur verwendete Glaswaren wurden vor Gebrauch 4 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert.

Gewebekulturschalen	55 cm ²	Greiner, Frickenhäusen
Zellschaber		Sarstedt, Nümbrecht
Glaspipetten	Pasteurpipetten, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml	Hirschmann Laborgeräte
Sterilfilter	0,22 µm Porengröße	Schleicher und Schüll, Dassel

Tabelle 2.2: Plastik und Glaswaren in der Zellkultur

2.1.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (a.d.) angesetzt. Das Wasser wurde über die Reinstwasseranlage Clear (Millipore) aufbereitet. Für die Zellkultur oder das Arbeiten mit RNA wurde pyrogenfreies Wasser (aqua ad injectabilia, a.a.i.) bzw. RNase/DNase-freies Wasser verwendet.

PBS (phosphate buffered saline) pH 7,4	140 mM NaCl (Roth, Karlsruhe) 2,7 mM KCl (Merck, Darmstadt) 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ (Merck, Darmstadt) 1,1 mM KH ₂ PO ₄ (Merck, Darmstadt)
PBS, das nicht für die Zellkultur verwendet wurde, wurde in einer 10fach konzentrierten Stocklösung angesetzt.	
EDTA-Stocklösung (0,5 M)	37,22 g EDTA (Roth, Karlsruhe) mit 180 ml a.d. versetzen. pH-Wert schrittweise mit 5 M NaOH auf 8,0 einstellen, bis sich das Salz vollständig gelöst hat. Volumen auf 200 ml mit a.d. auffüllen.
TE (Tris-EDTA) pH 7 oder 8	10 mM Tris Base (Roth, Karlsruhe) 1 mM EDTA (Roth, Karlsruhe)
TNN-Puffer	50 mM Tris-HCl; pH 7,5 (Roth, Karlsruhe) 120 mM NaCl (zum Teil auch 200 mM) 5 mM EDTA (Roth, Karlsruhe) 0,5 % (v/v) NP-40 (Applichem, Darmstadt) 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 2 mM Na ₃ VO ₄ 100 mM NaF (Fluka, Neu-Ulm)

... Fortsetzung

2 Material und Methoden

Fortsetzung ...

4 x SDS Probenpuffer	200 mM Tris Base (Roth, Karlsruhe) 400 mM Dithiothreitol (DTT) (Roth, Karlsruhe) 8 % Natriumdodecylsulfat (w/v) (Serva, Heidelberg) 0,4 % Bromphenolblau (w/v) (Aldrich, Deisenhofen) 40 % Glycerol (v/v) (Merck, Darmstadt)
Semi dry Blotpuffer	48 mM Tris (Roth, Karlsruhe) 39 mM Glycin (Roth, Karlsruhe) 0,04 % Natriumdodecylsulfat (w/v) (Serva, Heidelberg) 20 % Methanol (v/v) (Riedel, Niederlande)
10 x TBS (Tris buffered saline) pH 7,4	0,5 M Tris Base (Roth, Karlsruhe) 1,5 M NaCl (Roth, Karlsruhe)
TBST	TBS mit 0,1% Tween 20 (v/v) (Merck-Suchardt, Hohenbraun)
TBSTB	TBST mit 5% Magermilchpulver (w/v) (Applichem, Darmstadt)
10 x Lämmli-Laufpuffer	250 mM Tris Base (Roth, Karlsruhe) 1,9 M Glycin (Roth, Karlsruhe) 1 % Natriumdodecylsulfat (w/v) (Serva, Heidelberg)

Tabelle 2.3: Häufig verwendete Puffer und Lösungen

2.1.4 Software und Internet Seiten

TeX Live 2007	http://www.tug.org/texlive/ (Open Source)
Texmaker, Version 1.9.2	http://www.xmlmath.net/texmaker/ (Open Source)
OpenOffice.org, Version 3.1	http://de.openoffice.org/ (Open Source)
Microsoft Office	Microsoft Deutschland GmbH
Inkscape, Version 0.47	http://www.inkscape.org (Open Source)
Gnuplot, Version 4.4	http://www.gnuplot.info (Open Source)
GIMP Image Editor, Version 2.6	http://www.gimp.org (Open Source)
Irfanview 4.28	http://www.irfanview.com (Open Source)
Adobe™ Photoshop	Adobe Systems Inc., München
AnalySIS™	Soft Imaging System GmbH, Münster
ImageJ	http://imagej.nih.gov/ij/index.html (Open Source)
Stratagene MxPro	Stratagene, Heidelberg
PubMed	http://www.ncbi.nih.gov/pubmed/
NCBI National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/
Universal Probe Library Assay Design Center	http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/center.jsp

Tabelle 2.4: Software und Internet Seiten

2.1.5 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Klonalität	Spezies	Erstantikörper	Verdünnung	Anwendung
			Herkunft		
Miz1(H-190) α -Maus	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	1:60	Immunpräzipitation
Miz1 (10E2) α -Maus	monoklonal	Maus	AG Eilers, IMT Würzburg	1:400	Westernblot
Bezeichnung	Klonalität	Spezies	Zweitantikörper	Verdünnung	Anwendung
			Herkunft		
α -Maus IgG-HRP	polyklonal	Ziege	BioRad	1:7000	Westernblot

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper

2.1.6 Verwendete Zelllinien

Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Barbara Herkert, AG Eilers, Biozentrum Würzburg zur Verfügung gestellt.

Zelllinie	Beschreibung	Abkürzung
3T3 MEFs (WT, Δ POZ-Knockout)	Embryonale Mausfibroblasten, von Wildtyp und POZ-Domäne Knockout Mäusen. Immortalisierung nach dem 3T3-Protokoll. ¹	Wt MEFs Δ POZ MEFs
p19 ^{ARF} shRNA MEFs (WT, Δ POZ-Knockout)	Embryonale Mausfibroblasten, von Wildtyp und POZ-Domäne Knockout Mäusen. Immortalisierung durch Knockdown von p19 ^{ARF} mittels shRNA. ²	Wt MEFs ^{ARF} Δ POZ MEFs ^{ARF}

¹ Immortalisierung nach dem 3T3-Protokoll [TODARO and GREEN, 1963]. Die Zellen wurden am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung präpariert und bei der ersten Passage 1:3 gesplittet. Nach 3 Tagen wurden 30000 Zellen in einer 21 cm² großen Zellkulturschale ausgesät und für 3 Tage in Kulturmedium kultiviert. Dieser Vorgang wurde 18mal wiederholt. (Barbara Herkert, IMT Würzburg)

² Immortalisierung durch Knockdown von p19^{ARF} mittels shRNA. Nach der 3. Passage wurde ein shRNA-kodierendes Plasmid über eine stabile Transfektion in die Zellen eingebracht. Aus der in der Zelle exprimierten *short hairpin* RNA entstand eine siRNA, die spezifisch an ein Exon der von p19^{ARF} kodierten mRNA binden konnte. Durch RNA-Interferenz wurde das kurze komplementäre RNA-Stück abgebaut und somit ein Knockdown des Tumorsuppressorgens p19^{ARF} bewirkt [Mello and Conte, 2004]. Das Plasmid trug zusätzlich ein Resistenzgen für Puromycin, um eine Selektion und somit eine stabile Transfektion zu ermöglichen. (Barbara Herkert, IMT Würzburg)

Tabelle 2.6: Verwendete Zelllinien

Die Immortalisierung nach dem 3T3-Protokoll beruht auf dem Selektionsprinzip, das heißt, dass die Akquirierung von Mutationen Voraussetzung für das Überleben der Zellen ist. Dabei ist es selbstverständlich möglich, dass diese Mutationen neben dem Effekt, dass sie die Zellen immortalisieren, einen Einfluss auf den Phänotyp nehmen. So besteht die Möglichkeit, dass die Mutationen einen Effekt auf den Prozess der Autophagie haben. Die in dieser Arbeit herausgestellten Unterschiede zwischen Wildtyp und Δ POZ 3T3 MEFs sind somit nicht mit Sicherheit auf das Fehlen der POZ-Domäne zurückzuführen. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sollten daher mit

2 Material und Methoden

den Ergebnissen der über einen p19^{ARF} Knockdown immortalisierten MEFs verglichen werden, da anzunehmen ist, dass diese Zellen eine geringere Mutationsrate aufweisen.

2.1.7 Verwendete Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden freundlicherweise von der AG Eilers, Biozentrum Würzburg, zur Verfügung gestellt.

pB-○	pBABE <i>PUR</i> O	Leervektor ohne Gen	Puromycin-Resistenz
pB-Miz1	pBABE <i>PUR</i> O Miz1	Expressionsvektor für humanes Miz1	Puromycin-Resistenz
pB-GFP	pBABE H2B-GFP	Expressionsvektor für H2B-GFP	ohne Puromycin-Resistenz

Tabelle 2.7: Plasmide, die über eine retrovirale Infektion in ΔPOZ-Knockout Zellen eingebracht wurden

2.1.8 Reagenzien, Kits und sonstige Materialien

qPCR Core Kit for SYBR® Green I	Eurogentec, Belgien
TA-Cloning® Kit	Invitrogen, Darmstadt
Vektor pBluescript II Phagemid	Stratagene, Heidelberg
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
MAXIscript® Kit	Ambion, USA
Digoxigenin RNA Labeling Mix	Roche, Mannheim
Tri® Reagent	Sigma, Deisenhofen
RNase free DNase Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Nitrozellulosemembran Protran	Schleicher und Schuell, Dassel
Filterpapiere 1,2mm	Schleicher und Schuell, Dassel
Chemiluminescent Western Blot Detection System	Millipore, USA
Medical X-Ray Filme	Fuji, Düsseldorf
SeqLab (Dienstleistung)	Sequence Laboratories, Göttingen

Tabelle 2.8: Reagenzien und Kits

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Beginn im 37°C-Wasserbad vorgewärmt. Das Passagieren erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die 55 cm² großen Zellschalen wurden zunächst mit 10 ml PBS gewaschen. Durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA und Inkubation für 3–5 Minuten im Brutschrank wurden die Zellen vom Untergrund gelöst. Durch auf- und abpipettieren wurde die Zellsuspension homogen und konnte in Medium überführt werden. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die

2 Material und Methoden

PBS	0,01 M PBS-Mix in Pulverform. Die Lösung wird autoklaviert.	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA	Sigma, Deisenhofen
Medium	13,36 g/l Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) in Pulverform 2 g/l HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure) 3,7 g/l NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Sigma, Deisenhofen Serva, Heidelberg Merck, Darmstadt
Zusätze für Zellkulturmedium	10% (v/v) FCS (fetales Kälberserum) 1% N-Acetyl-N-Alanyl-L-Glutamin (200 mM) 0,6% (v/v) Gentamycin (10 mg/ml) für Selektion: 2 µg/ml Puromycin	PAA, Österreich PAA, Österreich PAA, Österreich Sigma, Deisenhofen

Tabelle 2.9: Kultivierung adhärenter Zellen

Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen gesplittet und in neuen Zellschalen ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C im Brutschrank unter wassergesättigter Atmosphäre und unter 5% CO₂-Begasung.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Diese besteht aus einem speziellen Objektträger auf dessen Oberfläche ein bestimmtes Muster von Kleinquadraten eingraviert ist. Links und rechts von den Kleinquadraten befinden sich Erhebungen, auf die ein Deckglas aufgelegt werden kann. Dabei entsteht zwischen Objektträger und Deckglas ein definierter Zwischenraum mit einem genau festgelegten Volumen.

Ein Tropfen der Zellsuspension wurde an den Rand des Deckgläschens gegeben und durch Kapillarkräfte verteilte sich die Zellsuspension gleichmässig zwischen Deckglas und Objektträger. Nun konnte die Zellzahl unter dem Phasenkontrastmikroskop ermittelt werden. Hierfür wurden die Zellen in 16 diagonal verlaufenden Kleinquadraten ausgezählt, was einem Volumen von 200 nl entspricht. Die Anzahl der gezählten Zellen multipliziert mit dem Faktor 5000 ergab die Anzahl der Zellen pro Milliliter.

2.2.1.3 Stimulation zu Autophagie

EBSS	Earl's Balanced Salt Solution enthält Natriumbikarbonat, keine Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
------	---	--------------------

Um die Zellen zu Autophagie zu stimulieren, wurden sie für sechs Stunden mit dem nährstoffarmen Medium EBSS inkubiert. Die 55 cm² großen Zellschalen wurden zunächst einmal mit EBSS gewaschen und dann für 6 Stunden mit 10 ml EBSS inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen in gleicher Weise für 6 Stunden mit DMEM inkubiert. Im Anschluss an die Hungerphase bzw. die Inkubation mit Vollmedium konnte RNA aus den Zellen isoliert werden oder es konnten Gesamtzelllysate für

die Proteinanalyse gewonnen werden. Für morphologische Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie wurden die Zellen fixiert.

2.2.1.4 Retrovirale Infektion von Δ POZ 3T3 MEFs und MEFs^{ARF}

Bei den Ergebnissen, die in 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} gewonnen wurden, muss berücksichtigt werden, dass die verwendeten Wildtyp und Δ POZ-Knockout Zellen aus verschiedenen Zelllinien stammen. Bei der Passagierung der Zellen ist es daher möglich, dass die Zellen unterschiedliche Mutationen erwerben, die neben dem Vorhandensein oder dem Fehlen der POZ-Domäne ebenfalls Einfluss auf den Phänotyp nehmen könnten. Um diese Unsicherheiten zu umgehen, sollten die Ergebnisse, die in Wildtyp und Δ POZ MEFs gewonnen wurden, anhand von Messungen innerhalb einer Zelllinie verifiziert werden. Durch eine retrovirale Infektion mit pB-Miz1 wurden Δ POZ MEFs mit humanem, nicht trunkiertem Miz1 substituiert. Die Genexpressionen bzw. Morphologie dieser Zellen wurden mit den Genexpressionen bzw. der Morphologie der mit einem Leervektor infizierten Δ POZ MEFs verglichen.

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von DNA in eukaryontische Zellen. Eine Möglichkeit DNA in Zellen einzubringen, ist die Infektion der Zelle mit einem Virus. Dabei wird das DNA-Stück, das man in die Zelle einbringen will, zunächst in die virale DNA integriert und die Zelle dann mit dem rekombinanten Virus infiziert. Die Infektion erfolgt über einen Rezeptor auf der Oberfläche der Zelle, an den der Virus andockt. Die Hülle des Virus fusioniert mit der Membran der Zelle und das virale Genom wird in die Zelle freigesetzt. Handelt es sich um Retroviren, wird das virale Genom in DNA umgeschrieben und in das Genom der Zelle integriert.

Die in dieser Arbeit für die retrovirale Infektion verwendeten pBABE-Viren wurden freundlicherweise von Mareike Müller, AG Elsässer zur Verfügung gestellt. Im Rahmen einer Diplomarbeit hatte sie Plasmide der pBABE *PUR0* Gruppe mittels Transfektion in Phoenixzellen, die als packaging-Zelllinie dienen, eingebracht. Die in den Phoenixzellen synthetisierten Retroviren wurden dann für die Infektion und die Übertragung der Plasmide genutzt. Die Plasmide, die in Δ POZ-Knockout Zellen eingebracht wurden, sind in Kapitel 2.1.7 auf Seite 26 dargestellt.

Es wurden sowohl Δ POZ-Knockout Zellen von 3T3 MEFs als auch Δ POZ-Knockout Zellen von MEFs^{ARF} mit den vektortragenden Viren infiziert. Da die Viren der pBABE-Gruppe eine Resistenzgen für Puromycin übertragen, konnte eine Selektion der infizierten 3T3 MEFs in Puromycinhaltigem Medium (2 μ g/ml) erfolgen. Eine Selektion der infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} war nicht möglich, da die Zellen bereits vor der retroviralen Infektion eine Puromycin-Resistenz aufwiesen. Bei diesen Zellen erfolgte eine transiente Infektion. Um den Zeitpunkt der abgeschlossenen Selektion der infizierten 3T3 MEFs zu bestimmen, wurden Zellen einer Zellschale mit pBABE H2B-GFP (pB-GFP) infiziert, da dieser Vektor keine Resistenz für Puromycin vermittelte. Die Selektion war abgeschlossen, wenn die Zellen in der pB-GFP Schale abgestorben waren.

Pro 55 cm² Gewebekulturschale wurden ca. 500000 Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 24 h erfolgte die Virusinfektion der Zellen. Hierfür wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und eine Mischung aus 5 μ l Polybrene (4 μ g/ μ l, Hexadimethrinbromid, Sigma, Deisenhofen) und 2 ml Medium auf die Zellen gegeben. Währenddessen wurden die Virusüberstände

schnell in einem 37°C-warmen Wasserbad aufgetaut und dann jeweils 3 ml der Überstände auf die Zellen pipettiert und verteilt. Nach einer Inkubation von 15 Stunden bei 37°C wurden 5 ml Medium auf jede Zellschale pipettiert und es folgte eine weitere Inkubation für ca. 30 Stunden bei 37°C. Je nach Dichte der Zellen wurden die Zellen nun 1:2 oder 1:3 gesplittet. Die Zellschale pB-GFP wurde zur Bestimmung der Infektionseffizienz beiseite gestellt (siehe Kapitel 2.2.1.5).

Sollte eine Selektion durchgeführt werden, wurde das Medium nun mit Puromycin versetzt (2 µg Puromycin pro 1 ml Medium). Die Zellen wurden weiterhin bei 37°C inkubiert bis die nicht-infizierten Zellen abgestorben und die infizierten Zellen ausreichend dicht gewachsen waren. Die Absterberate konnte anhand der Zellschale pB-GFP kontrolliert werden, da diese Zellen keine Puromycin-Resistenz vermittelt bekommen hatten. Nach Absterben der Zellen dieser Zellschale konnte davon ausgegangen werden, dass sich in den übrigen Gewebekulturschalen nur noch Zellen befanden, die erfolgreich mit dem Virus infiziert worden waren und auf diese Weise ein Resistenzgen erworben hatten. Die Zellen wurden nun so lange weiter kultiviert, bis ausreichend viele konfluent bewachsene Zellschalen für die jeweiligen Experimente zur Verfügung standen.

2.2.1.5 Bestimmung der Infektionseffizienz

Um den Erfolg der Virusinfektion nachzuweisen bzw. um die Infektionsrate zu quantifizieren, wurde ein Teil der Zellen, anstelle mit pB-Miz1 und pB- \emptyset , mit pBABE H2B-GFP infiziert. Die Infektion und Inkubation der Zellen erfolgte analog der Infektion mit pB-Miz1 und pB- \emptyset wie oben beschrieben. Am dritten Tag wurde vor Zugabe des Selektionsmediums eine Schale der pB-GFP Zellen fixiert und die Kerne gegengefärbt. Dazu erfolgte zunächst ein Waschschritt mit 10 ml PBS. Dann wurden 4 ml 4%iges PFA (Paraformaldehyd) auf die Zellen pipettiert und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschritte mit 10 ml PBS, wobei das PBS jedesmal für 5 Minuten auf den Zellen belassen wurde. Nun wurden die Zellkerne mit dem Hoechst-Farbstoff 33258 angefärbt. Es wurden 3 ml der Hoechst-Lösung (1:1500 mit PBS verdünnt) auf die Zellen getropft und für 10 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Zum Abschluß wurde erneut dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen, wobei die Zellen nach dem letzten Waschschritt in PBS belassen wurden. Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen mikroskopiert und zur Dokumentation 20 Fotos gemacht. Zur Auswertung der Infektionseffizienz wurden die GFP-positiven Zellen ausgezählt und in Beziehung gesetzt zur Gesamtzahl an gezählten Zellen. Die Infektionseffizienz wurde in Prozent berechnet.

2.2.2 Elektronenmikroskopie

Von mit pB- \emptyset und pB-Miz1 infizierten Δ POZ 3T3 MEFs wurden vor und nach Stimulation zur Autophagie elektronenmikroskopische Bilder angefertigt.

Die Zellen wurden nach abgeschlossener Selektion und nach 6-stündiger Inkubation mit DMEM bzw. EBSS zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Pro 55 cm² Gewebekulturschale wurden nun 10 ml Fixierlösung nach Ito und Karnovsky auf die Zellen pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Es folgten mehrere Waschschritte mit 10 ml 0,1 M Cacodylatpuffer. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Cacodylatpuffer auf den Zellen belassen und die Zellen konnten so mehrere Tage bei 4°C gelagert werden.

2 Material und Methoden

Cacodylatpuffer 0,1 M pH 7,35	21,4 g Na-Cacodylsäure (Serva) auf 1000 ml a.d.
Fixierlösung pH 7,35	10 ml 25% Paraformaldehyd (Fluka) 10 ml 25% Glutaraldehyd (w/v in a.d., Serva) 80 ml 0,1 M Cacodylatpuffer 0,05 g Pikrinsäure (Merck)
OsO ₄ /Kaliumferrocyanat-Lösung	2% Osmiumtetroxid (w/v in H ₂ O) (Roth) 3% Kaliumferrocyanat (w/v in H ₂ O) (Merck) vor Gebrauch 1:1 mischen
Maleatpuffer pH 5	0,2 M Maleinsäure in a.d.
Uranylacetat pH 5	0,3% (w/v) in 0,2 M Maleatpuffer
Epon	Mischung A 62 ml Glycidether 100 (Serva) 100 ml 2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (Serva) Mischung B 100 ml Glycidether 100 (Serva) 89 ml Methylnadicanhydrid Vor Gebrauch Mischung A und B vermischen, dann auf 10 ml 0,18 ml Dimethylaminomethylphenol zugeben und gut verrühren, Luftblasen vermeiden

Tabelle 2.10: Reagenzien in der Elektronenmikroskopie

Die nachfolgenden Schritte wurden freundlicherweise von der elektronenmikroskopischen Abteilung des Instituts durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst für 1 Stunde bei 4°C in Osmiumtetroxid / Kaliumferrocyanat-Lösung inkubiert. Dann folgten 3 Waschschrte mit Cacodylatpuffer, wobei die Lösung jeweils für 10 Minuten auf den Zellen belassen wurde. Über Nacht erfolgte die Kontrastierung der Proben in 0,3% Uranylacetat in 0,2 M Maleatpuffer. Am nächsten Tag wurde zunächst dreimal mit Cacodylatpuffer gewaschen und dann die Entwässerung der Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100%) und Propylenoxid durchgeführt. Hierfür wurden die Proben jeweils zweimal für 10 Minuten in den Alkoholverdünnungen und zum Schluss zweimal in Propylenoxid inkubiert. Zum Austausch des Propylenoxids durch das Kunstharz Epon wurden die Proben in einer Mischung aus Propylenoxid und Epon in aufsteigender Konzentration inkubiert, um dann über Nacht in 1 ml reinem Epon eingebettet zu werden. Am nächsten Tag wurde jede Probe in 3 Teile geteilt und jeweils $\frac{1}{3}$ der Zellen in eine Gelatinekapsel überführt. Die Kapseln wurden mit Epon aufgefüllt. Nach einer Aushärtung von 48 Stunden bei 60°C wurden die Gelatinekapseln durch heißes Wasser abgelöst und die Eponblöckchen mit einer Rasierklinge angespitzt. Die Ultradünnschnitte (Dicke 60–80 nm) wurden mit einem Diamantmesser auf einem Ultramikrotom OM U2 (Reichert) angefertigt, auf Nickelnetze übertragen und mit Bleicitratlösung kontrastiert [REYNOLDS, 1963]. Zur Auswertung der Proben diente das Elektronenmikroskop EM 109 (Zeiss).

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Kurzform PCR, für engl.: polymerase chain reaction) ist eine Methode, mit der DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden können. Typischerweise besteht sie aus 3 Schritten, einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt. Diese Schritte werden zyklisch wiederholt. Während des Denaturierungsschrittes werden die Template-DNA-Doppelstränge bei einer Temperatur von 94°C aufgeschmolzen. Es folgt die Anlagerung der Primer an die nun einzelsträngig vorliegenden DNA-Matrizenstränge. Primer sind kurze DNA-Sequenzen, die sich komplementär an die DNA-Matrizen anlagern und als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen. Dieser Vorgang wird als Annealing bezeichnet. Die Temperatur, bei der sich die Primer an die Matrize anlagern, liegt in der Regel zwischen 52°C und 62°C und richtet sich nach Art und Länge der verwendeten Primer. Im dritten als Elongation bezeichneten Schritt werden die neuen DNA-Stränge komplementär zur Matrize von der DNA-Polymerase synthetisiert. Als Ausgangspunkt für die Synthese dienen die kurzen, doppelsträngigen DNA-Bereiche, die sich durch Anlagerung der Primer an die Template-DNA gebildet haben. Die Synthese erfolgt dabei immer in 5'–3'-Richtung und erfolgt bei der verwendeten Taq-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C. Da die neu synthetisierten Stränge im nächsten Zyklus ebenfalls als Matrize dienen, verläuft die Vervielfältigung im Idealfall exponentiell.

PCR zur Synthese von Konstrukten

Um Sonden für den RNase Protection Assay herzustellen (Kapitel 2.2.3.8 auf Seite 47), wurden 11 Primerpaare ausgewählt, mit denen in einer Polymerasekettenreaktion DNA-Sequenzen von Autophagie-assoziierten Genen amplifiziert wurden. Tabelle 2.11 auf Seite 32 zeigt eine Liste der verwendeten Primer.

Zunächst wurde die PCR mit variablen Primerkonzentrationen und unterschiedlichen Annealing-temperaturen durchgeführt um auszutesten, unter welchen Bedingungen die Effektivität der Synthese am größten war. Die Primer wurden in TE-Puffer auf eine Konzentration von 10 pmol/μl verdünnt. Es wurden zwischen 1,5 und 3,5 μl Primerlösung pro Reaktionsansatz (siehe unten) verwendet. Die Reagenzien wurden auf Eis zusammenpipettiert und die Reaktion in einem Thermocycler gestartet. Je nach Primervolumen wurden zwischen 26 und 30 μl Wasser (a.a.i.) eingesetzt, so dass der Gesamtansatz 50 μl betrug.

Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

Template (cDNA, aus MEFs)	2 μl	
Primer forward	1,5-3,5 μl	Metabion, Martinsried
Primer reverse	1,5-3,5 μl	Metabion, Martinsried
5x Puffer	10 μl	Sigma, Deisenhofen
Taq	3 μl	Sigma, Deisenhofen
dNTPs 10 mM	2 μl	Sigma, Deisenhofen
H ₂ O (a.a.i.)	26-30 μl	

2 Material und Methoden

Das PCR-Programm umfasste 6 Schritte:

Initiale Denaturierung	94°C	2 min	} Diese Schritte wurden 34 mal wiederholt.
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	52–58°C	45 sec	
Elongation	72°C	2 min	
Abschließender Elongationsschritt	72°C	10 min	
Pause	4°C		

Das PCR-Produkt wurde in einem 2%igen TBE-Agarosegel neben einem DNA-Marker (TriDye™ 2-Log DNA Ladder, NEB) aufgetrennt. Durch Vergleich der Banden mit dem Marker konnte die Größe des Produktes bestimmt und so der Erfolg der PCR überprüft werden. Es wurde die Primerkonzentration und die Annealingtemperatur ausgewählt, die die eindeutigste Bande bei der Auftrennung im Agarosegel lieferten. Die PCR wurde dann unter diesen Bedingungen wiederholt und sofort nach Ende der PCR wurden die frisch synthetisierten PCR-Produkte mit dem Vektor pCR®2.1 ligiert. Zur Kontrolle wurde parallel ein Teil des PCR-Produktes erneut in einem 2%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und überprüft.

Gen	Primer	Sequenz	Größe Produkt (bp)
Atg3	for rev	AGTTTGTGGCAGCTGGAGAT CAGTGCTGAGCAATCTTGGA	314
Atg5	for rev	GGAGAGAAGAGGAGCCAGGT GCTGGGGGACAATGCTAATA	124
Atg7	for rev	ACCATGCAGGGAGCTAGAGA CCACTGAGGTTCAACATCCT	149
LC3a	for rev	GCCTGTCCTGGATAAGACCA GGGAGGCGTAGACCATGTAG	215
LC3b	for rev	CGTCCTGGACAAGACCAAGT CAGGAAGCCGTCTTCATCTC	193
Atg9b	for rev	TCACATCCAGAACCTGGACA AGGAAGACCAACAGGGGACT	291
Atg10	for rev	GAATGGAGAACAGCCAAGGA TGCAGGTCTCGTCACTTCAG	162
Miz1-C	for rev	GGCAAGCTCTTCACCACTTC GGTGCATACGTACGGCTTCT	330
Miz1-N	for rev	CGTTGACTTCAAGGCTCACA GTCCACGTTCTCAGGGCTAA	175
β -Aktin	for rev	TGTTACCAACTGGACGACA CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	393
GAPDH	for rev	AGAACATCATCCCTGCATCC CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT	360

Tabelle 2.11: Liste der verwendeten Primer für die herkömmliche PCR

PCR zur Kontrolle der cDNA

Die durch eine reverse Transkription synthetisierte cDNA (Kapitel 2.2.3.12 auf Seite 51) wurde auf ihre Funktionstüchtigkeit überprüft, indem sie als Template-DNA bei der Amplifikation von 18s eingesetzt wurde. 18s rRNA ist eine nicht kodierende RNA, die eine Untereinheit der ribosomalen RNA ist. Durch die PCR mit Primern für 18s wurde getestet, ob die cDNA Synthese erfolgreich verlaufen war.

Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

cDNA	1 µl	
10x Probenpuffer	5 µl	Sigma, Deisenhofen
dNTPs (10 mM)	1 µl	Sigma, Deisenhofen
Primer-Mix (18s for, 18s rev) 4-10 pmol Endkonzentration	5 µl	Metabion, Martinsried
Red Taq Polymerase	1,5 µl	Sigma, Deisenhofen
H ₂ O (a.a.i.)	36,5 µl	

Das PCR-Programm umfasste sechs Schritte:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min	} Diese Schritte wurden 14 mal wiederholt.
Denaturierung	94°C	45 sec	
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
Abschließender Elongationsschritt	72°C	10 min	
Pause	4°C		

Das PCR-Produkt wurde in einem 2%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt.

2.2.3.2 Real time PCR (qPCR)

Die Methode der Real time PCR beruht auf dem Prinzip einer einfachen Polymerasekettenreaktion, mit dem Unterschied, dass bei der Real time PCR die Menge des synthetisierten Produkts quantifiziert werden kann. Die Messung erfolgt über die Detektion des Fluoreszenzsignals eines zugegebenen Farbstoffes, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Parallel zur Zunahme der Template-Menge von Zyklus zu Zyklus, wird auch das Fluoreszenzsignal mit jedem Zyklus stärker. Voraussetzung dafür, dass von der Signalstärke auf die Template-Menge rückgeschlossen werden kann, ist, dass sich die PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase befindet. Nur in dieser Phase wird die doppelsträngige DNA annähernd verdoppelt. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenzstärke gemessen und ermittelt, nach welchem Zyklus der DNA-Amplifikation sich das Signal deutlich vom Hintergrund abhebt. Diese Zyklenanzahl wird Ct-Wert genannt und ist Grundlage für die anschließenden Berechnungen. Zunächst wird von dem Ct-Wert des interessierenden Gens der Ct-Wert eines Referenzgens abgezogen. Diese Normierung ist nötig, um Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge zweier zu vergleichender Proben auszugleichen. Als Referenz dienen Haushaltsgene

2 Material und Methoden

wie z. B. β -Aktin, GAPDH oder 18s, die nicht wie das zu untersuchende Gen reguliert werden. In dieser Arbeit wurde als Referenz β -Aktin verwendet. Durch Subtraktion des Ct-Wertes des Referenzgens von dem Ct-Wert des interessierenden Gens lässt sich der ΔCt -Wert berechnen.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

Nach der Normierung kann man nun davon ausgehen, dass unterschiedlich hohe ΔCt Werte auf eine unterschiedlich starke Expression des jeweiligen Gens und nicht auf Schwankungen der absoluten cDNA-Menge zurückzuführen sind.

Es erfolgte eine relative Quantifizierung der Ergebnisse, d. h. dass keine absoluten Werte für das Maß der Expression eines Gens ermittelt wurden. Vielmehr wurde die Expression eines Gens unter verschiedenen Bedingungen verglichen. Die Expression eines Gens in Wildtypzellen wurde mit der Expression desselben Gens in ΔPOZ -Knockout Zellen verglichen bzw. die Expression eines Gens nach Kultivierung mit DMEM mit der Expression dieses Gens nach Inkubation mit EBSS. Die Expressionsunterschiede können durch Subtraktion der ΔCt Werte berechnet werden.

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Zielgen, Bedingung n}} - \Delta Ct_{\text{Zielgen, Bedingung m}}$$

Auf diese Weise wurde die Expression in ΔPOZ -Knockout Zellen auf die Expression in Wildtypzellen bzw. wurde die Expression in mit EBSS inkubierten Zellen auf die Expression in mit DMEM inkubierten Zellen bezogen. Die Berechnung der Fold Induction erfolgte auf Grundlage der $2^{(-\Delta \Delta Ct)}$ Quantifizierungsmethode [Livak and Schmittgen, 2001]. Die Fold Induction gibt den n-fachen Expressionsunterschied eines Gens in Bezug auf die oben beschriebene Kontrollgruppe an.

$$\text{Fold Induction} = 2^{(-\Delta \Delta Ct)}$$

Dabei liegt die Annahme zugrunde, dass die Replikation ideal verläuft, das heißt, dass sich die vorhandene DNA-Menge in jedem Zyklus verdoppelt. Dies ist in der obigen Formel durch die Basis 2 ausgedrückt und entsprechend bedeutet ein Unterschied von 1 in den $\Delta \Delta Ct$ Werten eine doppelt oder halb so große DNA Menge. Ist die Annahme nicht zutreffend und die Replikation verläuft nicht ideal, das heißt, der Wert der Basis ist kleiner als 2, bedeutet dies einen systematischen Fehler bei der Berechnung der Fold Induction.

Die Primer wurden über die Universal Probe Library von Roche entworfen (siehe Kapitel 2.1.4 auf Seite 24). Beim Design der Primer wurde darauf geachtet, dass es sich um Intron-überspannende Primer handelte, das heißt, dass das Primerpaar auf jeweils 2 verschiedenen Exons lag. Dies soll gewährleisten, dass unspezifische Produkte, die auf einer Verunreinigung durch genomische DNA beruhen, anhand der Schmelzkurven als zusätzliche unspezifische Amplifikate leicht erkannt werden können. In Vorexperimenten wurde die optimale Konzentration der Primer für die qRT-PCR ausgetestet. Sie lag je nach Primer zwischen 100 und 200 nM. Die Liste der verwendeten Primer ist Tabelle 2.12 auf Seite 35 zu entnehmen. Bei den Konzentrationen, die in der Tabelle angegeben sind, handelt es sich um die Endkonzentrationen, die nach Zugabe aller Reagenzien im Ansatz vorlagen.

2 Material und Methoden

Gen	Primer	Länge (bp)	Sequenz	Größe Amplikon (bp)	Endkonzentration im Reaktionsansatz
ULK1	for	21	5'-tcctaggctctcctaccaagg-3'	81	100 nM
	rev	20	5'-ccaacagggtcagcaaatc-3'		
ULK2	for	20	5'-aaccacatggttctccaag-3'	93	100 nM
	rev	18	5'-tggtacaggggagcagga-3'		
Atg3	for	20	5'-gggtgtaatcacccagaag-3'	64	100 nM
	rev	21	5'-tgttggacagtggtggactaa-3'		
Atg4a	for	18	5'-cacactggcctccctttg-3'	90	100 nM
	rev	21	5'-agtctctccagttgttcagtcg-3'		
Atg4b	for	22	5'-ctagtgcttctcatccctctcc-3'	87	100 nM
	rev	19	5'-gggcatcatgaacagtgc-3'		
Atg4c	for	24	5'-ctatttatgttgccaggactgta-3'	105	100 nM
	rev	22	5'-aaataatgacagccttgtcagc-3'		
Atg4d	for	20	5'-gcctggtgtgtacgtctct-3'	90	100 nM
	rev	20	5'-tccactccgctgtaggatct-3'		
Atg5	for	20	5'-aagctctgcttccgcagtc-3'	136	200 nM
	rev	25	5'-tgaagaagtatatctgggtagctca-3'		
Atg7	for	22	5'-cacgggttcgataatgttctcc-3'	95	200 nM
	rev	21	5'-gaatccttctcgtctgtactg-3'		
LC3a	for	20	5'-catgagcaggttggtcaaga-3'	89	200 nM
	rev	18	5'-ccatgctgtgctggtga-3'		
LC3b	for	18	5'-ccccaccaagatcccagt-3'	104	200 nM
	rev	18	5'-cgctcatgttcacgtgg-3'		
Atg9a	for	23	5'-tcctttctacctacatgctcttcg-3'	92	100 nM
	rev	19	5'-ttctgctctgcacaaatcc-3'		
Atg9b	for	21	5'-gggacatccaggtgttttaca-3'	95	200 nM
	rev	18	5'-ttccaggaggcgagactg-3'		
Atg10	for	24	5'-gctgtgctaaagaattcacagaaa-3'	96	200 nM
	rev	23	5'-aggtaaattcagaccaaccactg-3'		
Atg12	for	18	5'-ggaaacctcccgagacac-3'	92	100 nM
	rev	20	5'-ccacagcccatttttgtt-3'		
Atg16L1	for	21	5'-gcagctactaagcgactctcg-3'	90	100 nM
	rev	20	5'-tgggatggaagagacagagc-3'		
Atg16L2	for	18	5'-ccaccgacatgaggact-3'	89	100 nM
	rev	19	5'-ctgcccattccacctcaga-3'		
Myc	for	20	5'-cctagtgtgcatgaggaga-3'	93	200 nM
	rev	22	5'-tcacagacaccacatcaattt-3'		
Miz1-N	for	20	cggtggtgcacctagacatca	91	100 nM
	rev	20	gttctcagggtctaaggctca		
Miz1-C	for	20	ccgaagccttatcagagagc	76	200 nM
	rev	20	tcctcttgtccgtcttctcc		
β -Aktin	for	20	5'-ctaaggccaaccgtgaaaag-3'	104	200 nM
	rev	20	5'-accagaggcatacagggaca-3'		

Tabelle 2.12: Liste der verwendeten Primer für die qPCR

2 Material und Methoden

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde das qPCR Core Kit for SYBR® Green I von Eurogentec verwendet. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Reagenzien wurden wie angegeben verwendet und auf eine 96-well Platte übertragen. Die Konzentration der Primer im Reaktionsansatz betrug 100 bzw. 200 nM (Tabelle 2.12 auf Seite 35). Es wurde stets eine Doppelbestimmung von jeder Probe durchgeführt. Die Platten wurden vor Beginn der Messung mit Folien verschweißt und die PCR-Reaktion in einem Mx 3000P™ Cyclyer (Stratagene, Heidelberg) gestartet.

Primermix (for und rev, Endkonzentration im Ansatz 100–200 nM)	5 µl
cDNA (1:5 - 1:15 verdünnt)	2,5 µl
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
50 mM MgCl ₂	1,8 µl
5 mM dNTPs	1 µl
Hot Goldstar (Enzym)	0,125 µl
SYBR® Green-Lösung	0,75 µl
H ₂ O	11,4 µl

PCR-Programm:

95°C	10 min	} 50 Zyklen
95°C	15 sec	
60°C	20 sec	
72°C	20 sec	
95°C	1 min	
55°C	30 sec	
95°C	30 sec	

Die Auswertung der Daten erfolgte in einer Excel-Tabelle. Aus den Daten der Doppelbestimmungen der Ct-Werte wurden die Mittelwerte bestimmt. Da lediglich 2 Werte in die Berechnung der Mittelwerte eingingen, wurde keine Standardabweichung angegeben. Anhand der $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ Quantifizierungsmethode wurden die Werte der Fold Induction ermittelt. Die Fold Induction der Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen wurde 1 gesetzt und die Genexpressionen in den Vergleichszellen auf diesen Wert bezogen.

Die graphische Darstellung erfolgte in Balkendiagrammen. Es wurde eine logarithmische Skala gewählt und der y-Achsen Ursprung auf 1 gesetzt. Entsprechend beginnen die abgebildeten Balken bei 1, wobei Werte kleiner 1 nach unten abgetragen werden und Werte größer 1 nach oben zeigen. Werte, die genau 1 betragen, werden nicht als Balken dargestellt.

Da es aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, mehr als zwei biologische Replika pro Gen zu messen, wurden Grenzwerte festgesetzt, anhand derer eine Einteilung der Gene zu verschiedenen Gruppen vorgenommen wurde.

Die Grenzwerte wurden anhand der $\Delta\Delta Ct$ Werte festgelegt. Hätte man die Grenzen anhand der Fold Induction gewählt und zum Beispiel auf $\pm 0,5$ festgesetzt, würde eine Änderung auf 0,5 halb so viel PCR-Produkt entsprechen wohingegen die Änderung auf 1,5 eine Zunahme des PCR-Produktes aber keine Verdoppelung bedeutet. Wählt man die Grenzen anhand der $\Delta\Delta Ct$ Werte spiegelt ein Unterschied von ± 1 tatsächlich eine Verdoppelung respektive Halbierung wider.

Die Grenzwerte wurden so festgelegt, dass eine Änderung des $\Delta\Delta Ct$ Wertes um 0,585 zum Über- bzw. Unterschreiten der Schwelle führt. Das heißt die Grenzwerte der Fold Induction liegen bei der 1,5fachen (obere Grenze; $1,5 = 2^{0,585}$) und der 0,67fachen (untere Grenze; $0,67 = 2^{-0,585}$) Genexpression bezogen auf die Genexpression der Vergleichszelle. Dabei wurde darauf geachtet, die Schwelle möglichst hoch zu setzen, um die Wahrscheinlichkeit einer falschen Einteilung gering zu halten. Diese wäre möglich, wenn die gemessenen Unterschiede nicht die wahre Genexpression in der Zelle widerspiegeln, sondern durch ein technisch bedingtes Hintergrundrauschen zustande kommen. Andererseits konnte die Schwelle nicht zu hoch gewählt werden, da dann für einige Gene, die schon bei geringer Regulation starke Effekte haben können, irrtümlicherweise angenommen worden wäre, dass eine Stimulation zu keiner Änderung der Genexpression führt, da die Werte dieser Gene die Schwelle nicht überschritten hätten.

Da $-\Delta\Delta Ct = \log_2(FoldInduction)$ gilt, können die Grenzwerte für verschiedene Werte der Fold Induction über die Formeln

$$\text{Oberer Grenzwert} = 2^{(-\Delta\Delta Ct - 0,585)}$$

$$\text{Unterer Grenzwert} = 2^{(-\Delta\Delta Ct + 0,585)}$$

berechnet werden.

2.2.3.3 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung von zwei DNA-Stücken über ihre Enden. Katalysiert wird diese Reaktion von dem Enzym Ligase unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen.

In dieser Arbeit wurden die mittels PCR neu synthetisierten DNA-Stücke mit dem Vektor pCR®2.1 (Invitrogen, Darmstadt) ligiert. Später erfolgte eine Umklonierung in den Vektor pBluescript II Phagemid (Stratagene, Heidelberg).

Ligation mit pCR®2.1

Bei dem Vektor pCR®2.1 von Invitrogen handelt es sich um einen TA-Cloning® Vektor. TA-Cloning® Vektoren zeichnen sich dadurch aus, dass die Verknüpfung von DNA-Stück und Vektor nicht über spezifische Schnittstellen erfolgen muss, sondern dass sich die DNA-Stücke über eine Hybridisierung der überstehenden komplementären Basen Thymin und Adenin verbinden können. Während der PCR fügt die Taq-Polymerase an die 3'-Enden des synthetisierten DNA-Stücks die Base Adenin hinzu. Der pCR®2.1 Vektor von Invitrogen enthält an den 5'-Enden eine überstehende Base Thymin. Durch Hybridisierung der beiden Basen und in Anwesenheit des Enzyms Ligase erfolgt die Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor.

Der Vektor verleiht eine Ampicillin-Resistenz, wodurch Bakterien mit dieser Resistenz selektiert werden können. Desweiteren enthält er ein lacZ'-Gen, wodurch eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht wird. Das lacZ'-Gen kodiert für ein Fragment der β -Galaktosidase, die in An-

2 Material und Methoden

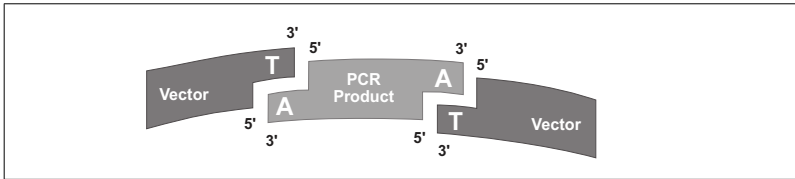


Abbildung 2.1: Methode des TA Cloning[®] (Invitrogen, Darmstadt)

wesenheit von X-Gal und IPTG den Klon blau färbt. Ist allerdings ein DNA-Fragment erfolgreich in den Vektor kloniert worden, so ist das lacZ'-Gen unterbrochen, da die Klonierungsstelle innerhalb des Gens liegt. In diesem Fall ist die Synthese der β -Galaktosidase blockiert und der Klon bleibt weiß. Auf diese Weise können Klone, bei denen eine Klonierung erfolgreich verlaufen ist, von solchen unterschieden werden, in die kein DNA-Fragment integriert wurde. Der Vektor und

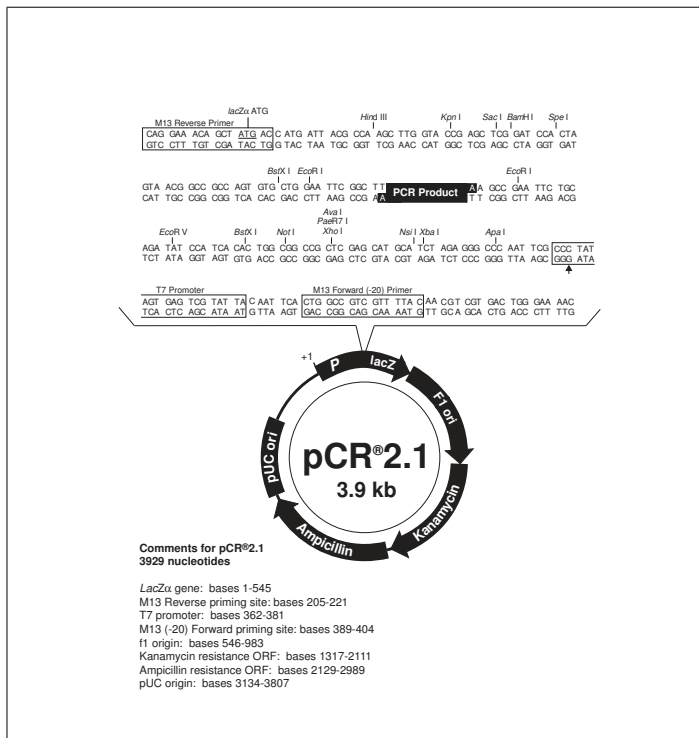


Abbildung 2.2: Vektorkarte von pCR[®]2.1 (Invitrogen, Darmstadt)

die Lösungen stammten aus dem TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Darmstadt) und wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Reagenzien wurden in der angegebenen Reihenfolge auf Eis in ein

2 Material und Methoden

Steriles Wasser	5 µl
10x Ligationspuffer	1 µl
Vektor pCR®2.1	2 µl
Frisches PCR-Produkt	1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

0,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und über Nacht in einem Wasserbad bei 14°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transformation in E. coli-Bakterien (Kapitel 2.2.3.4 auf Seite 40).

Ligation mit pBluescript II Phagemid

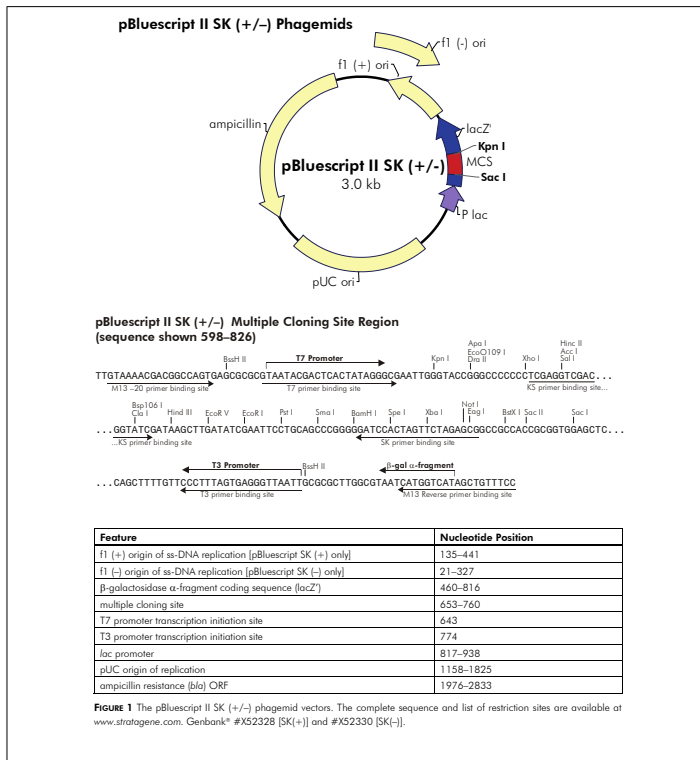


Abbildung 2.3: Vektorkarte von pBluescript II Phagemid (Stratagene, Heidelberg)

Die Ligation mit pBluescript II Phagemid (Stratagene, Heidelberg) erfolgte über Schnittstellen von EcoRI. Das DNA-Fragment war im Vorfeld mit EcoRI aus dem Vektor pCR[®]2.1 herausgeschnitten worden und der Bluescript-Vektor durch einen Verdau ebenfalls mit EcoRI linearisiert worden (siehe Kapitel 2.2.3.6 auf Seite 44). Der Bluescript-Vektor besitzt genau wie der Vek-

tor pCR®2.1 ein lacZ'-Gen, das eine Blau-Weiß-Selektionierung ermöglicht und überträgt eine Ampicillin-Resistenz.

Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

Steriles Wasser	2,5 µl	
10x Ligationspuffer	1 µl	NEB, Schwalbach
Vorbereiteter Bluescript Vektor	2 µl	Stratagene, Heidelberg
Extrahiertes DNA-Fragment	5 µl	
T4 DNA Ligase	1 µl	NEB, Schwalbach

Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 10 µl. Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei 16°C.

2.2.3.4 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von DNA in Bakterienzellen. Sie ermöglicht eine Vervielfältigung der in die Bakterien eingegrachten DNA.

In dieser Arbeit wurden DNA-Stücke, die mit dem Vektor pCR®2.1 oder mit dem Vektor pBlue-script ligiert worden waren, als Plasmide in E. coli-Bakterien eingebracht. Eine Selektionierung der Bakterienklone bei denen die Transformation erfolgreich verlaufen war, erfolgte durch die Kultivierung in Ampicillin-haltigem Medium bzw. auf Ampicillin-haltigen Agarplatten. Die Aufnahme des Plasmids vermittelte eine Resistenz gegen Ampicillin, so daß nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, überleben konnten. Eine weitere Auswahl wurde durch eine Blau-Weiß-Selektionierung erreicht (Kapitel 2.2.3.3 auf Seite 37).

Bakterien	RapidTrans™ TAM1 Competent E. coli (Active Motif, USA)
LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	10 g Bacto-Tryptone 1% (w/v) (Difco, USA) 5 g Hefeextrakt 0,5% (w/v) (Difco, USA) 10 g NaCl 1% (w/v) (Roth, Karlsruhe) Bestandteile unter dem Abzug abgewogen. In 800 ml a.d. gelöst und pH-Wert mit 5 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Volumen auf 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert.
Ampicillin	50 mg/ml, (Boehringer) auf eine Endkonzentration von 50 µg/ml verdünnt
LB-Agar-Platten (2% (w/v))	20 g Bacto-Agar (Difco) wurden in 1 Liter LB-Medium gelöst und die Mischung autoklaviert. Nach Abkühlen auf unter 50°C wurde unter der Sterilbank 1 ml Ampicillin zugegeben und jeweils ca. 30 ml der Lösung in 55 cm² Petrischalen (Greiner) gegossen, so dass der Boden bedeckt war. Nach Abkühlen und Aushärten des Agars mit offenem Deckel unter der Sterilbank wurden die Schalen bei geschlossenem Deckel und der Agarseite nach oben in Folie verpackt bei 4°C gelagert.
IPTG	100 mM (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
X-Gal	40 mg/ml in DMSO (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Tabelle 2.13: Reagenzien für die Transformation

2 Material und Methoden

1 µl Plasmid-DNA und 20 µl Bakterien wurden auf Eis in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und für 45 Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Zeit konnte sich die Plasmid-DNA der Bakterienmembran anlagern. Anschließend erfolgte eine Inkubation für genau 45 Sekunden in einem 42°C-warmen Wasserbad, während der die Plasmid-DNA die Bakterienmembran durchdringen und in das Bakterium eindringen konnte. Die Proben wurden sofort danach wieder auf Eis gestellt. Unter der Sterilbank wurden 180 µl LB-Medium auf die transformierten Bakterien pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden für eine Blau-Weiß-Selektionierung je 50 µl X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galactopyranosid 8) und 50 µl 100 mM IPTG auf LB-Agarplatten ausgestrichen und gewartet, bis die Lösungen eingezogen waren. Dann wurden je 100 µl der Bakterienlösungen auf den Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten enthielten Ampicillin, wodurch eine Selektionierung der Bakterien mit einer Resistenz gegen Ampicillin erfolgte. Über Nacht wurden die Platten mit dem Deckel nach unten im 37°C-Wärmeschrank inkubiert.

2.2.3.5 Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA

Nach Selektionierung der Bakterienklone, die das Plasmid mit DNA-Insert aufgenommen hatten, sollten die Bakterien weiter angereichert werden, um eine Vervielfältigung der Plasmid-DNA zu erreichen. Die auf diese Weise vermehrte DNA sollte dann in größerer Menge wieder aus dem Bakterium isoliert und zur weiteren Verwendung aufgereinigt werden (Mini- bzw. Maxi-Präparation).

Auswahl positiver Klone und Kultivierung in LB-Medium

Die auf der Agarplatte ausgestrichenen Bakterien waren über Nacht im Wärmeschrank zu Kolonien herangewachsen, wobei es sich bei den Zellen in einer Kolonie um Klone handelte, d. h. um Zellen mit dem gleichen genetischen Material. Neben weißen Kolonien, bei denen die Klonierung erfolgreich verlaufen war, waren auch blaue Kolonien auf den Platten nachzuweisen, die wahrscheinlich nur den Vektor ohne das PCR-Produkt aufgenommen hatten (Blau-Weiß-Selektion). Nun wurde unter der Sterilbank jeweils ein weißer Klon mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und die Spitze in 2 ml LB-Medium, das vorher mit Ampicillin versetzt worden war (1 µl Ampicillin/ml LB), überführt. Die 2 ml-Kulturen wurden über Nacht bei 37°C in einem Schüttler für Bakterienkulturen inkubiert.

Sollte im Anschluss eine Maxi-Präparation durchgeführt werden, wurde eine größere Menge Plasmid-DNA benötigt. Hierfür wurden 100 µl der 2 ml-Kulturen in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin überimpft und über Nacht in einem Schüttler für Bakterienkulturen bei 37°C inkubiert.

Sollte die Bakteriensuspension für eine Mini-Präparation mittels des NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey-Nagel verwendet werden, erfolgte ebenfalls zuerst eine weitere Animpfung, indem 100 µl der 2 ml-Kulturen mit 4 ml LB, versetzt mit Ampicillin, über Nacht inkubiert wurden.

Mini-Präparation zur Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Bei einer Mini-Präparation wird Plasmid-DNA aus Bakterienzellen isoliert und aufgereinigt. In dieser Arbeit wurden Mini-Präparationen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die nach der Transformation gezüchteten Bakterienklone Plasmide mit dem gewünschten DNA-Insert aufgenommen hatten. Die Plasmid-DNA wurde über eine Mini-Präparation mit Hilfe selbst angesetzter Lösungen

2 Material und Methoden

isoliert und aufgereinigt und anschließend ein Restriktionsverdau durchgeführt. Wies das durch den enzymatischen Verdau aus dem Vektor geschnittene Fragment die gewünschte Größe auf, wurde im Anschluß erneut DNA aufgereinigt für eine Umklonierung in den Bluescript Vektor. Hierfür wurde eine Mini-Präparation der Plasmid-DNA mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey-Nagel durchgeführt, um eine größere Reinheit der DNA zu erreichen. Sollte DNA des Bluescript Vektors mit Insert isoliert und aufgereinigt werden, um anschließend eine DNA-Sequenzierung durchführen zu können, wurde die Mini-Präparation ebenfalls mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel durchgeführt.

Durchführung der Mini-Präparation mittels selbst angesetzter Lösungen

Lysislösung	1% (w/v) SDS 0,2 M NaOH
Neutralisationslösung	11,5 ml (11,5% (v/v)) Essigsäure 60 ml 5 M Kaliumacetat 28,5 ml a.d.

Tabelle 2.14: Reagenzien für die Mini-Präparation

Unter der Sterilbank wurden 900 µl der 2 ml-Kulturen entnommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakteriensuspension wurde für 5 Minuten bei 13000 x g und RT in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Vom Überstand wurden 600 µl abgenommen und verworfen. Die Bakterien wurden in den restlichen 300 µl durch Vortexen resuspendiert. Als nächstes wurden 300 µl Lysis-Lösung zugegeben und die Zellen durch vorsichtiges Invertieren des Reaktionsgefäßes lysiert. Dann wurden 300 µl Neutralisationslösung dazupipettiert und erneut vorsichtig invertiert. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 13000 x g und RT wurden 800 µl des Überstands in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand enthielt die isolierten Plasmide in Lösung, die durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt wurden. Nach einer sorgfältigen Durchmischung durch Vortexen, erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 15 Minuten bei 4°C und 13000 x g. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet einmal mit 500 µl kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 5 Minuten bei 4°C und 13000 x g wurden alle Alkoholreste entfernt und das Pellet für einige Minuten an der Luft getrocknet. Dann wurde es in 50 µl TE, versetzt mit RNase, aufgenommen. Die RNase (Stock = 10 mg/µl) wurde hierfür 1:100 in TE-Puffer verdünnt.

Zur Kontrolle, ob das Plasmid ein DNA-Insert der erwarteten Größe enthielt, wurde im Anschluß ein analytischer Verdau mit dem Enzym EcoRI durchgeführt und die DNA in einem TBE-Agarosegel aufgetrennt.

Durchführung der Mini-Präparation mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey-Nagel
Sollte die Plasmid-DNA isoliert und aufgereinigt werden, um anschließend eine Umklonierung in den Bluescript-Vektor durchzuführen oder um die DNA sequenzieren zu lassen, wurde die Mini-Präparation mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel (Düren) durchgeführt. Die

Anwendung erfolgte, soweit nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben. Die Zentrifugationen wurden alle bei RT und 11000 x g durchgeführt.

2 ml der *E. coli*-Bakterienkulturen wurden für 30 Sekunden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zur Lyse der Zellen wurden 250 µl Puffer A1 zugegeben und das Zellpellet durch Vortexen resuspendiert. Nun wurden 250 µl Puffer A2 dazupipettiert und nach 8-maligem Invertieren eine Inkubation bei RT für 5 Minuten angeschlossen. Nach Zugabe von 300 µl Puffer A3 wurde erneut 8 Mal invertiert und dann für 5 Minuten zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde auf eine NucleoSpin® Plasmid Säule geladen und durch Zentrifugieren für 1 Minute an die Säule gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschritte. Zunächst wurden 500 µl Puffer AW ohne vorherige Anwärmung auf die Säule pipettiert und 1 Minute lang zentrifugiert, dann wurden 600 µl Puffer A4 zugegeben und erneut für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule für weitere 2 Minuten zum Trocknen zentrifugiert. Zum Auffangen der DNA wurde die Säule in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und die DNA durch Zugabe von 50 µl Puffer AE nach einer Inkubation von 1 Minute bei RT durch 1-minütige Zentrifugation eluiert.

Die eluierte DNA wurde entweder, wenn es sich um den Vektor pCR®2.1 mit Insert handelte, zur Umklonierung in den Bluescript-Vektor verwendet oder, wenn es sich um den Vektor pBluescript mit Insert handelte, wurde sie verwendet, um das DNA-Fragment zu sequenzieren.

Maxi-Präparation

Um größere Mengen von sehr reiner Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde eine Maxi-Präparation der Plasmid-DNA durchgeführt. Hierfür wurde das NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet.

200 ml des mit einem Bakterienklon angeimpften LB-Mediums wurden zunächst in Zentrifugationsbecher überführt und für 10 Minuten bei 5000 x g und 5°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in 12 ml RNase A haltigem Resuspensionspuffer durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Die Mischung wurde in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 12 ml Lysispuffer und 5-maligem Invertieren des Reaktionsgefäßes wurden die Bakterienzellen aufgeschlossen. Während der Ansatz für 5 Minuten bei RT inkubiert wurde, erfolgte die Beladung der Filtersäule mit 25 ml Äquilibrationpuffer. Zur Neutralisierung der Bakterienmischung wurden dann 12 ml Neutralisationspuffer zugegeben, 15-mal invertiert und das Zelllysate auf die Säule geladen. Nachdem die Flüssigkeit vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde der Filter zur maximalen Plasmidausbeute mit 15 ml Äquilibrationpuffer gewaschen. Nun wurde der Filter entfernt und die Säule mit 25 ml Waschpuffer gewaschen. Es folgte der Elutionsschritt, bei dem die Plasmid-DNA durch Zugabe von 15 ml Elutionspuffer in einem neuen 50 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Zur Präzipitation der DNA wurden 10,5 ml Isopropanol zugegeben und kräftig gevortext. Nach einer Inkubation von 2 Minuten bei RT wurde die Mischung 30 Minuten lang bei mindestens 9000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA Pellet einmal mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei mindestens 9000 g und 4°C. Der Ethanol wurde vollständig entfernt und das Pellet einige Minuten an der Luft getrocknet. Dann wurde es in 200 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.3.6 Restriktionsverdau

Bei einem Restriktionsverdau wird DNA spezifisch durch sogenannte Restriktionsendonukleasen geschnitten. Restriktionendonukleasen sind Enzyme, die ursprünglich erstmals in Bakterien entdeckt wurden, und die bestimmte Basenabfolgen in doppelsträngiger DNA erkennen und spalten können. Beim Spalten dieser spezifischen DNA-Sequenzen entstehen sogenannte „glatte Enden“ (blunt ends), wenn die Schnittstellen am DNA-Doppelstrang genau gegenüber liegen, oder es entstehen „klebrige Enden“ (sticky ends), wenn die Schnittstellen verschoben sind und überhängende Einzelstränge entstehen.

	Miniprep-DNA	Maxiprep-DNA
DNA	10 µl	1 µg
Puffer 10 x	2 µl	2 µl
DTT (50mM) 10x	2 µl	2 µl
BSA (10 mg/ml) 10x	2 µl	2 µl
EcoRI (20000 units/ml)	1 µl	1 µl
H ₂ O	3 µl	auf 20 µl

Tabelle 2.15: Restriktionsverdau, analytischer Ansatz

	Umklonierung		Sonden
	Isolierung DNA Fragment aus pCR 2.1	Linearisierung pBluescript	
DNA	5 µg	20 µg	10 µg
Puffer 10 x	10 µl	10 µl	10 µl
DTT (50mM) 10x	10 µl	10 µl	10 µl
BSA (10 mg/ml) 10x	10 µl	10 µl	10 µl
EcoRI (20000 units/ml)	2,5 µl	2,5 µl	
HindIII oder SmaI (je 20000 units/ml)			4 µl
H ₂ O	auf 100 µl	auf 100 µl	auf 100 µl

Tabelle 2.16: Restriktionsverdau, präparativer Ansatz

In dieser Arbeit wurden analytische Restriktionsverdaus durchgeführt, um den Erfolg von Ligationreaktionen zu überprüfen. Durch Maxi- oder Minipräparationen isolierte Plasmid-DNA wurde mit dem Enzym EcoRI verdaut und der Ansatz anschließend in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Für einen analytischen Ansatz wurde 1 µg DNA eingesetzt, wenn die DNA durch Maxipräparation gewonnen wurde und die Konzentration bekannt war. Stammt die DNA aus einer Minipräparation, war die Konzentration nicht bekannt und es wurden 10 µl DNA verdaut. Der Gesamtansatz eines analytischen Verdaus betrug 20 µl.

Präparative Verdaus wurden für die Umklonierung von DNA-Stücken aus dem Vektor pCR®2.1 in den Vektor pBluescript durchgeführt. Das DNA-Insert wurde mit EcoRI aus dem Vektor pCR®2.1 herausgeschnitten. In diesen Ansätzen wurden 5 µg DNA verdaut. Außerdem wurde der Bluescript Vektor durch einen präparativen Verdau mit EcoRI linearisiert. Hierfür wurden 20 µg Vektor-DNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen beider Reaktionen betrug 100 µl.

Für die Herstellung von Sonden für den RNase Protection Assay wurden ebenfalls präparative Verdaus durchgeführt. Der Verdaus erfolgte mit den Enzymen HindIII oder SmaI. Es wurden 10 µg DNA aus Maxi-Präparationen von pBluescript eingesetzt.

Alle Lösungen wurden von der Firma NEB (Schwalbach) bezogen. Die Reagenzien wurden wie in den Tabellen 2.15 und 2.16 auf Seite 44 zusammenpipettiert und dann kurz anzentrifugiert. Zusätzlich wurde bei analytischen Verdaus für jede Probe eine Negativkontrolle ohne Enzym angesetzt.

Die Proben wurden bei analytischen Verdaus 1,5 Stunden inkubiert und anschließend in einer Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Bei präparativen Verdaus erfolgte eine Inkubation für 6 Stunden bei 37°C.

„Cippen“ von DNA

Wurde ein präparativen Verdaus dazu genutzt, den Bluescript-Vektor zu linearisieren, bestand die Möglichkeit, dass sich der Vektor wieder mit sich selbst ligierte, da der Verdaus mit nur einem Enzym durchgeführt wurde. Die Religation des linearisierten Vektors wurde verhindert, indem die überstehenden Phosphatreste am 5'-Ende des Vektors entfernt wurden. Diese Reaktion wird von einer alkalischen Phosphatase, der calf intestinal phosphatase (CIP), katalysiert.

Nach Inkubation des präparativen Verdaus bei 37°C wurde die Reaktion durch 20-minütige Hitzeinaktivierung bei 65°C abgestoppt. Es wurden 100 µl 50 mM Tris/HCl pH 8 und 1 µl CIP (Calf Intestinal Phosphatase, 0,5 unit/µg Vektor, 10000 unit/ml, NEB) dazupipettiert und der Ansatz wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion wieder abgestoppt indem 4 µl 0,5 M EDTA zugegeben wurden und der Ansatz in einem Wasserbad für 20 Minuten auf 65°C erhitzt wurde.

Der „gecippete“ Bluescript-Vektor wurde in einem 1%igen, die verdauten DNA-Fragmente in einem 2%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Die Banden, die dem Vektor bzw. dem DNA-Fragment entsprachen, konnten anschließend mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden.

2.2.3.7 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld. Werden DNA-Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und ein elektrisches Feld angelegt, wandert die DNA in Richtung der Anode, da sie negativ geladene Phosphatgruppen trägt. Die Wanderungseigenschaften hängen von Größe und Struktur der DNA sowie von der Konzentration des Agarosegels ab. Erkalte Agarose, bildet sie ein dreidimensionales Netzwerk, dessen Porengröße von der Konzentration des Agarosegels abhängt. Höher prozentige Gele bilden ein kleineres Maschenwerk und eignen sich daher zur Auftrennung von kleineren DNA-Fragmenten, während niedriger konzentrierte Gele optimal sind, um Fragmente mit einer größeren Basenpaarlänge aufzutrennen. In einer Standard Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Fragmente zwischen 0,5 und 25 kb aufgetrennt werden. Es werden Agarosegele mit Konzentrationen zwischen 0,5-4% verwendet. Je kleiner DNA-Fragmente sind, desto schneller wandern sie durch das Netzwerk des Agarosegels. Sie können daher der Größe nach aufgetrennt werden. Zur ungefähren Bestimmung der Größe in kb-Länge wird bei jeder Elektrophorese auch ein Größenmarker aufgetragen. Durch Vergleich der Banden mit dem

2 Material und Methoden

Marker kann die Länge des DNA-Fragments ungefähr abgelesen werden. Einen weiteren Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit hat die Form, in der die DNA vorliegt bzw. ihr Stokesradius. Lineare DNA wandert langsamer im Agarosegel als ringförmige DNA der gleichen bp-Länge (z.B. Plasmide). Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, das in die DNA- bzw. RNA-Moleküle interkaliert, kann die DNA bzw. RNA bei Durchleuchtung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

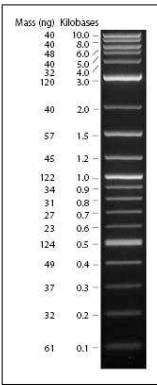


Abbildung 2.4: TriDye™ 2-Log DNA Ladder (NEB, Schwalbach)

TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	90 mM Tris (Roth, Karlsruhe) 10 mM Borsäure (Fisher scientific, USA) 2 mM EDTA (Roth, Karlsruhe) aus 5 x Stammlösung angesetzt
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml (Sigma, Deisenhofen)
6 x DNA-Auftragslösung	0,4 % Bromphenolblau (w/v) (Sigma, Deisenhofen) 0,4 % Xylencyanol (w/v) (Sigma, Deisenhofen) 50 % Glycerol (v/v) (Merck, Darmstadt)
Agarose	Gibco, Karlsruhe
DNA-Größenstandard	TriDye™ 2-Log DNA Ladder (NEB, Schwalbach)

Tabelle 2.17: Reagenzien für die Agarosegel-Elektrophorese

Es wurden 1,2 g Agarose für 1%ige bzw. 2,4 g Agarose für 2%ige Gele abgewogen und mit TBE-Puffer auf 120 ml aufgefüllt. Das Gemisch wurde in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle mehrmals aufgekocht und das verdunstete Wasser durch Zugabe von Wasser bis zum Ausgangsgewicht wieder ersetzt. Nachdem die Agarose vollständig geschmolzen war, wurden 1,6 µl Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,13 µg/ml) zugegeben und das Gel in den abgedichteten und mit Proben-Kämmen ausgestatteten Gelträger gegossen. Nach Abkühlen und Erstarren des Gels wur-

de der Probenkamm entfernt, der Gelträger in die Elektrophoresekammer gesetzt und die Kammer mit TBE aufgefüllt, so dass das Gel vollständig bedeckt war. Die Proben wurden mit 6 x DNA-Auftragslösung versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Neben den Proben wurde ein Größenmarker aufgetragen, mit dem später die Größe der Banden bestimmt werden konnte. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 bis 120 V. Anschließend wurden von dem Gel unter UV-Beleuchtung Fotos zur Dokumentation angefertigt.

Isolierung von DNA aus TBE-Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA aus TBE-Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet.

Zunächst wurde die dreifache Menge Puffer QG zu den Gelproben gegeben. Die Mischung wurde 10 Minuten lang in einem Wasserbad auf 50°C erhitzt und alle 3–4 Minuten gevortext, wodurch sich das Gel in dem Puffer löste. Für die Bindung der DNA an die QIAquick Membran war es wichtig, dass der pH-Wert unter 7,5 betrug. Dies wurde anhand eines Farbcodes überprüft und musste ggf. ausgeglichen werden. Nach Zugabe eines Gel-Volumens an Isopropanol und kräftigem Vortexen, wurde die Mischung auf eine QIAquick Säule aufgetragen und für 1 Minute bei 13000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl Puffer QG gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation von 1 Minute und 13000 x g wurde auch dieser Durchfluss verworfen. Nun wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE versetzt und nach einer Inkubation von ca. 5 Minuten bei RT 1 Minute lang bei 13000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Zur Elution der DNA wurden 30 µl TE-Puffer direkt auf die Membran der Säule pipettiert, 5 Minuten inkubiert und dann 1 Minute bei 13000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde, nachdem er in einem sauberen 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen worden war, noch einmal auf die Membran aufgetragen und ein zweites Mal zentrifugiert.

Zur Kontrolle des DNA-Fragments wurden 5 µl der Probe in einem TBE-Agarosegel aufgetrennt. 1 µl des linearisierten Vektors wurde zur Kontrolle ebenfalls auf ein TBE-Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Proben wurden entweder direkt für eine Ligationsreaktion mit dem Bluescript Vektor eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.8 Synthese von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden durch in vitro

Transkription für einen RNase Protection Assay

Der RNase Protection Assay ist ein Nucleotidhybridisierungsverfahren, mit dem bestimmte Nucleotidsequenzen aus einem Gemisch aus RNA-Molekülen herausgefiltert werden können. Dieses Meßverfahren beruht darauf, dass sich zwei einzelsträngig vorliegende komplementäre RNA-Sequenzen zu einem Doppelstrang verbinden können. Die Detektion der RNA erfolgt mit Hilfe von entsprechenden RNA-Sonden, die mit den gesuchten RNA-Sequenzen hybridisieren können und mit diesen doppelsträngige RNA-Abschnitte bilden. Es handelt sich bei den Sonden um einzelsträngige, ca. 300 bp-große RNA-Nucleotidsequenzen, die mit Digoxigenin markiert und komplementär zum gesuchten RNA-Abschnitt sind. Die markierte Sonde wird mit dem RNA-Gemisch unter Bedingungen inkubiert, die eine Hybridisierung erleichtern. Nach der Hybridisierung werden die nicht mit der Sonde hybridisierten, einzelsträngigen RNA-Abschnitte durch Zugabe des Enzyms Ribonuklea-

se, das spezifisch nur einzelsträngige RNA spaltet, abgebaut. RNA-Abschnitte, die mit der Sonde hybridisiert haben, sind vor dem Abbau durch Ribonuklease geschützt. Sie können in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und über eine Fluoreszenzreaktion detektiert werden. Hierfür wird die RNA-RNA-Hybride mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch an das Digoxigenin der Sonde bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft ist.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der RNA-Sonden diente die über eine Maxi-Präparation gewonnene Plasmid-DNA des Vektors pBluescript mit DNA-Insert. Sie stellte die Matrize für die in vitro Transkription der RNA-Polymerase dar. Die Transkription erfolgte mit Digoxigenin-markierten Nukleotiden.

Restriktionsverdau mit HindIII oder SmaI

Die Plasmid-DNA wurde zunächst in einem präparativen Verdau linearisiert. Um sowohl sense als auch antisense Sonden zu erhalten, wurde die Plasmid-DNA in einem Ansatz mit HindIII verdaut und in einem anderen mit SmaI. Der Reaktionsansatz des Verdaus ist in Kapitel 2.2.3.6 auf Seite 44 dargestellt.

Reinigung und Fällung

Als nächstes folgte die Reinigung und Fällung der linearisierten DNA. Hierfür wurden die Proben der linearisierten DNA mit Aqua dest. auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 500 µl Phenol stark gevortext. Nach einer Zentrifugation von 13000 x g für 5 Minuten bei RT wurde der wässrige Überstand (ca. 500 µl) abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl einer Mischung aus Phenol und Chloroform (1:1) zugegeben und nach starkem Vortexen erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde wiederum abgenommen. Als nächstes wurde der Überstand mit 500 µl Chloroform versetzt, gevortext und wieder zentrifugiert. Es folgte die Fällung der DNA, indem der Überstand mit der 2,5fachen Menge 100%igem Ethanol und 1/10 der Menge 3 M NaAcetat (pH 5,2) versetzt, durch Vortexen stark gemischt und dann für eine Stunde bei -20°C eingefroren wurde. Danach wurde die Mischung für 10 Minuten bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es folgten 2 Waschschrte mit 500 µl 70%igem kalten Ethanol. Hierfür wurde der Ethanol auf das Pellet pipettiert und 10 Minuten bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Vorgang wiederholt. Zum Schluß wurden durch Anzentrifugieren alle Ethanol-Reste gesammelt, mit einer Pipette entfernt und das Pellet angetrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl 10 mM Tris/HCl pH 8 gelöst.

Transkription

Die linearisierte und gereinigte Plasmid-DNA wurde nun in vitro transkribiert, wobei als Bausteine mit Digoxigenin markierte Nukleotide verwendet wurden. Für die Transkription wurde das MAXIscript® Kit von Ambion verwendet. Als Nukleotide diente der Digoxigenin RNA Labeling Mix von Roche.

1 µg DNA wurde mit sterilem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und mit Puffer versetzt. Dann wurden der RNA Labeling Mix und die RNA-Polymerase dazupipettiert. Es wurde die doppelte Menge der vom Hersteller empfohlenen Menge an RNA Labeling Mix eingesetzt. War das Plasmid mit

2 Material und Methoden

HindIII linearisiert worden, wurde die T3-Polymerase verwendet; war der Verdau mit SmaI durchgeführt worden, wurde mit T7-Polymerase transkribiert. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Linearisiertes Plasmid	1 µg
Steriles Wasser	auf 12 µl
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
10 x Digoxigenin RNA Labeling Mix	4 µl
Enzym Mix (T3 oder T7)	2 µl

Nach Synthese des RNA-Strangs wurde die DNA-Matrize abgebaut, indem dem Ansatz 1 µl TURBO DNase zugegeben und erneut für 15 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Zur Lagerung wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

2.2.3.9 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde das Tri[®]Reagent (Sigma) verwendet. Zunächst wurde das Medium unter der Sterilbank aus der Zellschale abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml gekühltem PBS gewaschen. Dabei wurde das PBS nicht direkt auf die Zellen aufgebracht, sondern an den Rand der Schale, um ein vorzeitiges Lösen der Zellen zu verhindern. Nach Entfernen des PBS folgte das Lösen und Aufschliessen der Zellen durch Zugabe von 1 ml Trizol. Je nach Zelldichte wurden 2 Zellschalen gepoolt. Mit einem sterilem Zellschaber wurden die Zellen vom Untergrund abgelöst und mit einer Pipette auf- und abpipettiert, bis eine homogene Zellsuspension entstanden war. Das Zellgemisch wurde dann in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nun wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Es folgte eine Inkubation von 3 Minuten bei RT und dann eine 15-minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C. Mit einer Pipette wurden 700-800 µl des klaren, wässrigen, RNA-haltigen Überstands abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isoopropanol zugegeben, kräftig gevortext und die Mischung für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 12000 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet einmal mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen. Der Ansatz wurde für 2-3 Minuten bei RT inkubiert und dann für 5 Minuten bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Ethanol wurde vollständig abgenommen und das Pellet für einige Minuten an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Mittels Photometrie wurde die Konzentration der RNA bestimmt. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.2.3.10 DNase-Verdau der RNA

Um die Reinheit der isolierten RNA zu erhöhen und um eventuelle, in der RNA-Probe verbliebenen DNA-Reste abzubauen, wurden alle RNA-Proben einem DNase-Verdau unterzogen. Es wurde das RNase free DNase Kit von Qiagen oder das Total RNA Isolation NucleoSpin[®] RNA II Kit von Macherey-Nagel verwendet.

DNase-Verdau mittels RNase free DNase Kit (Qiagen)

Für den DNase-Verdau mit Hilfe von Qiagen RNeasy Mini-Säulen, wurden 100 µg RNA mit Wasser auf ein Volumen von 100 µl gebracht und mit 350 µl RLT-Puffer, der zuvor mit β -Mercaptoethanol (Merck) im Verhältnis 1:100 versetzt wurde, und 250 µl Ethanol vermischt. Die Mischung wurde auf eine RNeasy Mini-Säule geladen und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 350 µl Puffer RW1 zugegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und es folgte der DNase-Verdau. Hierfür wurde die Membran der Säule mit 80 µl DNase I, 1:8 verdünnt in RDD Puffer, versetzt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Dann wurden 350 µl Puffer RW1 zugegeben und 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es erfolgte ein Waschschritt mit 500 µl RPE-Puffer. Nach einer Zentrifugation von 15 Sekunden bei 10000 rpm und Verwerfen des Durchflusses, wurde der Waschschritt wiederholt und die Membran durch zweiminütige Zentrifugation bei 10000 rpm getrocknet. Zur Elution wurden 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der Säule pipettiert, 1 Min bei RT inkubiert und 15 Sek bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in einem neuen RNase-freiem Reaktionsgefäß aufgefangen. Zur maximalen Ausbeute wurde der Elutionsschritt wiederholt. Die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

DNase-Verdau mittels NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey-Nagel)

Bei der Verwendung des NucleoSpin® RNA II Kit von Macherey-Nagel wurden zunächst 350 µl RA1-Puffer, der zuvor 1:100 mit β -Mercaptoethanol vermischt wurde, auf die RNA-Proben pipettiert und stark gevortext. Der Ansatz wurde auf eine NucleoSpin® Filtereinheit geladen und bei 11000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt und gut gevortext worden war, wurde er auf eine NucleoSpin® RNA II Säule geladen und für 30 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Membran der Säule durch Zugabe von 350 µl MDB-Puffer und einminütiger Zentrifugation bei 11000 x g entsalzt. Nun folgte der DNase-Verdau. 95 µl der DNase I, die zuvor 1:10 in DNase Reaktions-Puffer verdünnt worden waren, wurden direkt auf die Membran der Säule pipettiert und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Als nächstes wurden mehrere Waschschritte durchgeführt. Zunächst wurden 200 µl RA2-Puffer zugegeben und für 30 s bei 8000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 600 µl RA3-Puffer wurde erneut für 30 s bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Waschschritt mit 250 µl RA3-Puffer wiederholt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation von 11000 x g war die Membran getrocknet, es folgte die Elution der RNA. Es wurden 100 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, für 1 Minute bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss in einem sauberen, RNase-freien 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen.

Nach dem DNase-Verdau wurde die Konzentration der DNase-verdauten RNA-Proben photometrisch bestimmt und 1 µg RNA wurde zur Kontrolle in einem TBE-Agarosegel aufgetrennt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3.11 Konzentrationsbestimmung mittels Photometrie

Die Konzentration von DNA- oder RNA-haltigen Lösungen kann durch photometrische Messung bestimmt werden. Monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge und Intensität wird durch die zu untersuchende Lösung geschickt und es wird die Lichtintensität nach Durchtritt gemessen. Je nach Konzentration der Lösung wird die Intensität des auf die Lösung fallenden Lichtstrahls nach Durchtritt durch die Lösung unterschiedlich stark abgeschwächt. Dieses, von der Konzentration der Lösung abhängige Verhältnis, wird als Transmission bezeichnet. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich aus der Absorption, d. h. dem negativen dekadischen Logarithmus der Transmission, die gesuchte Konzentration bestimmen. Verschiedene Stoffe haben ihr Absorptionsmaximum bei unterschiedlichen Wellenlängen des Lichts. Das Absorptionsmaximum von DNA und RNA liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm.

Die Messung erfolgte im Photometer, indem die mit TE-Puffer verdünnten Proben in Küvetten pipettiert wurden und die Absorption gegen reines TE als Leerwert gemessen wurde.

Die Konzentration konnte dann über

$$c = A \cdot \text{Konstante} \cdot \text{Verdünnung}$$

berechnet werden, wobei A die gemessene Absorption ist. Die vorgenommene Verdünnung der Probe wurde über den Faktor *Verdünnung* berücksichtigt. Der Wert der *Konstante* war von der Probe abhängig und betrug für doppelsträngige DNA $50 \mu\text{g/ml}$, für RNA $40 \mu\text{g/ml}$ und für einzelsträngige DNA $20 \mu\text{g/ml}$.

2.2.3.12 cDNA-Synthese

Die DNase-verdauten RNA-Proben wurden mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Bei der reversen Transkription werden DNA-Stränge synthetisiert, die komplementär zur verwendeten RNA sind. Für die cDNA-Synthese wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas verwendet.

Zunächst wurden $1 \mu\text{g}$ RNA und $1 \mu\text{l}$ Random Hexamer Primer ($0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in ein $0,2 \text{ ml}$ -Reaktionsgefäß pipettiert und das Volumen mit Wasser auf $12 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Es folgte die Zugabe von $4 \mu\text{l}$ 5x Reaktionspuffer, $1 \mu\text{l}$ RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor ($20 \text{ U}/\mu\text{l}$) und $2 \mu\text{l}$ 10mM dNTP Mix. Nach einer erneuten Inkubation von 5 Minuten bei 25°C wurde $1 \mu\text{l}$ M-MuLV Reverse Transcriptase ($20 \text{ U}/\mu\text{l}$) zu der Probe gegeben. Die Inkubation bei 25°C wurde für 5 Minuten fortgesetzt, dann folgten eine Inkubation von 60 Minuten bei 42°C und eine Hitzeinaktivierung bei 70°C für 10 Minuten. Die cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.4 Proteinbiochemie

2.2.4.1 Herstellung eines Gesamtzelllysats für die Immunpräzipitation

Die konfluent gewachsenen ΔPOZ-Knockout Zellen, die mit pB-Miz oder pB-∅ infiziert worden waren, wurden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml PBS auf die Zellschale pi-

pettiert und die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Insgesamt wurden die Zellsuspensionen von acht konfluent gewachsenen 55 cm²-Gewebekulturschalen in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Zum Pelletieren der Zellen wurde für 5 Minuten bei 700 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Sollte eine Proteinbestimmung durchgeführt werden, wurde das Zellpellet mit 800-1000 µl TNN-Puffer (siehe Kapitel 2.2.4.3) versetzt und durch 10maliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 15 Minuten bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.4.2 BCA-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe eines sogenannten BCA-Assays bestimmt werden. Die Methode beruht auf der Reduktion von zweiwertigen zu einwertigen Kupferionen durch die in einem zu bestimmenden Proteingemisch vorhandenen Proteine, wobei die Menge der reduzierten Kupferionen proportional zur Proteinmenge ist. Die Bicinchoniinsäure (BCA) reagiert dann mit den einwertigen Kupferionen und es entsteht ein farbiger Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Durch photometrische Messung kann die Proteinkonzentration indirekt über die Farbreaktion bestimmt werden. Für die Erstellung einer Eichgeraden wird die Absorption einer Standardreihe gemessen, deren Proteingehalt (BSA) bekannt ist.

Kupfersulfat-Pentahydrat	4%ig in Wasser
Bicinchoniinsäure	Sigma, Deisenhofen
BSA-Stocklösung	10 mg/ml Roth, Karlsruhe

Tabelle 2.18: Reagenzien für den BCA-Assay

Für die Erstellung einer Eichgeraden wurde eine BSA-Standardreihe angesetzt. Hierfür wurde eine BSA-Stocklösung (Tabelle 2.18) auf Konzentrationen von 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 und 1,4 µg/µl mit Wasser verdünnt. Auf jeweils 10 µl der Verdünnungen wurden nun 40 µl Wasser pipettiert. Die Proteinlösungen wurden entweder unverdünnt oder 1:10 vorverdünnt eingesetzt. Es wurden 2-10 µl des Zellysats mit Wasser auf ebenfalls 50 µl aufgefüllt. Dann wurde eine Mischung aus Kupfersulfatlösung und Bicinchoniinsäure im Verhältnis 1:50 frisch angesetzt und jeweils 1 ml auf die Proben und die Standardreihe pipettiert. Nach kurzem Vortexen und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C im Heizblock konnte die Absorption bei 562 nm photometrisch bestimmt werden. Die Absorption wurde vorher mit einem Leerwert (Bicinchoniinsäure-Kupfersulfat-Mischung) abgeglichen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und die Proteinkonzentration konnte dann anhand einer Eichgeraden in einer Excel-Tabelle bestimmt werden.

2.2.4.3 Immunpräzipitation

Mit Hilfe einer Immunpräzipitation kann ein bestimmtes Protein aus einem Proteingemisch herausgefiltert werden. Die Erkennung des Proteins erfolgt dabei über eine Antigen-Antikörper-Reaktion,

bei der ein Antikörper sein Antigen - also das zu isolierende Protein - im Proteingemisch bindet. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex kann über den Fc-Teil des Antikörpers an Protein-A binden, das an Sepharose-Kügelchen gekoppelt ist. Die Protein-A-Sepharose mit dem daran gebundenen Antigen-Antikörper-Komplex kann dann aufgrund ihrer höheren Dichte in einem Zentrifugations-schritt pelletiert und die ungebundenen Proteine mit dem Überstand entfernt werden. Durch Zugabe von SDS kann der Komplex gelöst werden und die Proteine der Probe in einer Polyacrylamid-gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im anschließenden Westernblot detektiert werden.

Pro IP wurden 1,2 mg Protein eingesetzt. Die Konzentration der Proteinlösungen wurde über einen BCA-Assay bestimmt (siehe Kapitel 2.2.4.2 auf Seite 52) und das Volumen auf 1 ml mit TNN-Puffer (Tabelle 2.3 auf Seite 24) aufgefüllt. Die Proben wurden mit 15 µl Miz1-Antikörper H-190 (polyklonal, Kaninchen, Santa Cruz) versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Proben ohne Antikörper und mit 3 µl Rabbit-IgG (1 µg/µl, Sigma, Deisenhofen) angesetzt.

Am nächsten Tag wurde zunächst die 1:1 in 20%igem Ethanol gelöste Protein-A-Sepharose mit PBS gewaschen. Auf 250 µl Sepharose wurde 10 ml PBS pipettiert und die Mischung bei 400 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Sepharose-Beads wieder 1:1 in TNN-Puffer aufgenommen, indem 125 µl TNN-Puffer auf die Sepharose pipettiert wurde. Dann wurden 60 µl der gewaschenen Sepharose auf die mit dem Antikörper versetzten Proteinproben gegeben und für 2 Stunden bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Im Anschluß wurden die mit Protein-A-Sepharose versetzten Protein-Lysate für 3 Minuten bei 400 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde ebenfalls auf das Polyacrylamidgel aufgetragen, um zu kontrollieren, dass Miz1 vollständig über die Beads aus der Proteinlösung isoliert worden war. Es folgte eine Reihe von Waschschritten. Hierfür wurden die mit Protein-A-Sepharose versetzten Protein-Lösungen mit 1 ml TNN-Puffer versetzt, bei 400 x g und 4°C für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde insgesamt 4 mal durchgeführt und der letzte Überstand sehr genau abgenommen. Die gewaschenen Sepharose-Protein-Lysate wurden mit 40 µl 2xSDS-Ladepuffer versetzt, die Reaktionsgefäße zum Mischen mit dem Finger angeschnippt und für 5 Minuten in einem 95°C-Wasserbad inkubiert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben bei 2000 x g und RT für 4 Minuten abzentrifugiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 8%igen Polyacrylamidgel.

2.2.4.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

In einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese werden Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. SDS bewirkt dabei eine Denaturierung der Proteine, so dass Wechselwirkungen zwischen Proteinen ausgeschaltet werden und die Proteine sich nur noch in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. SDS verleiht Proteinen eine negative Ladung, was bewirkt, dass eigene negative Ladungen des Proteins keine Rolle mehr spielen. Je größer das Protein ist, umso mehr SDS lagert es an, so dass die aufgebrachte Ladung proportional zur Proteingröße ist. Das Polyacrylamid-Gel bildet eine Matrix mit engmaschigen Poren, die es ermöglicht, die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen.

2 Material und Methoden

Kleine Moleküle wandern leichter und demnach schneller durch das Maschenwerk als große. Zur Abschätzung der Proteingröße läuft neben den Proben ein Größenmarker mit. Bei der sogenannten diskontinuierlichen Elektrophorese werden zwei verschiedene Gele, ein Sammel- und ein Trenngel, verwendet. Zunächst wird die Proteinlösung an der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel in einer schmalen Bande gesammelt, erst anschließend erfolgt die eigentliche Auftrennung im Trenngel. Im Anschluß an die Elektrophorese können die Proteine z. B. über einen Westernblot detektiert werden.

Die Glasplatten, Abstandhalter und Probenkämme wurden vor der Verwendung mit 70%igem Ethanol gereinigt und die Apparatur fertig aufgebaut. Dann wurde das Trenngel angesetzt. Hierfür wurden die Reagenzien, wie in Tabelle 2.19 angegeben, zusammenpipettiert und gemischt, wobei die Radikalstarter TEMED und APS erst ganz zum Schluß zugegeben wurden.

	Trenngel 8%	Sammelgel
a.d.	4,6 ml	6,8 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)	2,7 ml	1,7 ml
1,5 M Tris pH 8,8 (Roth, Karlsruhe)	2,5 ml	—
1,0 M Tris pH 6,8 (Roth, Karlsruhe)	—	1,25
10% SDS (Serva, Heidelberg)	100 µl	100 µl
10% APS in a.d. (BioRad, München)	150 µl	100 µl
TEMED (BioRad, München)	6 µl	6 µl

Tabelle 2.19: Reagenzien für das Polyacrylamidgel

Mit einer Pasteurpipette wurde das Trenngel in den Apparat gefüllt und sofort mit Isopropanol bedeckt, um eine ebene Oberfläche zu erzeugen. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgossen und der Gelrand mit a.d. gespült. Nun wurde das Sammelgel gemischt. Analog zum Vorgehen beim Trenngel wurden alle Reagenzien zusammenpipettiert, die Radikalstarter zuletzt zugegeben und die Mischung auf das Trenngel in die Apparatur eingefüllt. Zur Formung von Geltaschen wurde ein Probenkamm in das Sammelgel gesteckt. Nach der vollständigen Polymerisation des Sammelgels wurde die Apparatur in das Elektrophoresebecken gesetzt, das Becken mit Lämmli-Puffer (Tabelle 2.3 auf Seite 24) gefüllt und die Probenkämme gezogen.

Die Proteinproben wurden mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Zum Sammeln aller Tropfen wurden die Proben für 4 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und danach in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgte neben einem Molekulargewichtsstandard (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas, St. Leon-Rot) im Sammelgel bei 15 mA und im Trenngel bei 30 mA.

2.2.4.5 Westernblot

Ein Westernblot wird genutzt, um Proteine, die in einer Elektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine Membran zu übertragen und auf ihr zu fixieren. Durch die Inkubation mit einem Antikörper können die Proteine dann spezifisch markiert und über einen Zweitantikörper detektiert werden.

Das Acrylamidgel wurde nach der Protein-Auftrennung zunächst für 15 Minuten in Semi-Dry-Blotpuffer äquilibriert. Die Nitrozellulosemembran (6x8 cm, Tabelle 2.8 auf Seite 26) und die Filterpapiere (7x9 cm, Tabelle 2.8 auf Seite 26) wurden auf die richtige Größe zugeschnitten. Die Nitrozellulosemembran wurde zuerst in a.d. gewaschen und dann für 15 Minuten in Semi-Dry-Blotpuffer getränkt. Die Filterpapiere wurden ebenfalls in Semi-Dry-Blotpuffer eingeweicht. Der Blot wurde dann in folgender Reihenfolge aufgebaut:

Kathode - Filterpapier - Gel - Membran - Filterpapier - Anode

Um eventuell vorhandene Luftblasen zu beseitigen, wurde der Stapel mit einem Falkon ausgerollt. Das Blotten erfolgte bei 120 mA für 45 Minuten ($2,5 \text{ mA/cm}^2$).

2.2.4.6 Immundetektion

Der Nachweis von Proteinen, die in einem Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen worden sind, kann über eine Immundetektion erfolgen. Dabei werden die Proteine zuerst mit einem Erstantikörper spezifisch markiert, um dann über einen Zweitantikörper sichtbar gemacht zu werden. Bei dem Zweitantikörper handelt es sich um einen Enzym-gekoppelten Antikörper, wobei das Enzym, eine Peroxidase, in einer Chemilumineszenz-Reaktion die Umsetzung eines chemischen Substrats (Luminol) katalysiert. Bei dieser Reaktion werden Elektronen angeregt, die bei Rückkehr in ihren Grundzustand Licht emittieren, welches auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann.

Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran nach dem Blotten für 45 Minuten in TBSTB (Tabelle 2.3 auf Seite 24) inkubiert. Dann wurde sie mit 3 ml des in TBSTB verdünnten Erstantikörpers (siehe Kapitel 2.1.5 auf Seite 25) in eine Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten in TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und dann für 1 Stunde mit dem Zweitantikörper inkubiert. Hierfür wurde der Zweitantikörper wie in Kapitel 2.1.5 auf Seite 25 beschrieben mit TBSTB verdünnt und die Membran in der Antikörper-Lösung geschwenkt. Es folgten weitere drei Waschschritte mit TBST für jeweils 10 Minuten. Zum Abschluß wurde einmal mit TBS gewaschen. Nun wurde die Membran in eine Folie auf eine ebene Unterlage gelegt und die Substratlösung (siehe Tabelle 2.8 auf Seite 26), die kurz vorher angesetzt wurde, auf die Membran getropft. Es erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei RT. Sofort im Anschluß wurde die Lumineszenz detektiert, indem die Membran auf einen Super RX Röntgenfilm (Fuji) in eine Röntgenkassette gelegt wurde. Die Belichtungszeit betrug etwa 30–40 Minuten und wurde experimentell ermittelt. Nachdem der Film entwickelt und fixiert worden war (Bereitstellung der Apparatur und Lösungen freundlicherweise durch Volkwin Kramer), wurde er gewaschen und an der Luft getrocknet. Zur Dokumentation wurde der Film gescannt und elektronisch gespeichert.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss des Knockouts der POZ-Domäne von Miz1 und Inkubation mit EBSS auf die Expression Autophagie-assoziiierter Gene und Myc

Der Einfluss von Miz1 auf die Genexpression von Autophagie-assoziierten Genen wurde in 3T3 MEFs und in MEFs^{ARF} untersucht (Kapitel 2.1.6 auf Seite 25). Von jeder Zelllinie standen Wildtypzellen und Δ POZ-Knockout Zellen zur Verfügung. In Δ POZ Zellen wurde die POZ-Domäne von Miz1 durch einen Knockout des N-terminalen Bereichs von Miz1 ausgeschaltet. Die POZ-Domäne ist für die Funktion von Miz1 essentiell [Herold et al., 2002; Peukert et al., 1997]. Das Fehlen der POZ-Domäne verhindert die Dimerisierung und damit das korrekte Funktionieren von Miz1 [Stead et al., 2007; Stogios et al., 2010]. Es sollte untersucht werden, wie der Knockout der POZ-Domäne von Miz1, d.h. das Fehlen von funktionstüchtigem Miz1 die Expression der ausgewählten Autophagie-assoziierten Gene und die Expression von Myc beeinflusst. Hierfür wurde deren Genexpression in Wildtypzellen und Δ POZ Zellen miteinander verglichen.

Der autophagische Prozess wird bei Zellen im Hungerzustand verstärkt. Eine Möglichkeit, Zellen zu Autophagie zu stimulieren, ist die Inkubation mit AS-armem Medium. Durch den Vergleich der Genexpressionen, die in hungernden bzw. in mit Vollmedium inkubierten Zellen gemessen wurden, konnte der Einfluss des Aminosäureentzugs auf die Expression der Autophagie-assoziierten Gene bestimmt werden. Es wurde geprüft, ob die Genexpression durch EBSS induzierbar ist und falls dies der Fall war, ob es sich um eine von der POZ-Domäne von Miz1 abhängige oder unabhängige Regulation handelte.¹

Durch ein Screening sollte herausgefunden werden, welche Gene durch den Knockout der POZ-Domäne von Miz1 oder durch AS-Entzug positiv oder negativ reguliert werden. Aufgrund der großen Anzahl der zu untersuchenden Gene wurden im Rahmen dieser Arbeit nur zwei biologische Replika durchgeführt. Wegen der entsprechend geringen Menge an Messdaten konnte keine vollständige statistische Auswertung erfolgen und die Ergebnisse sind entsprechend vorsichtig zu interpretieren. Die gewonnenen Anhaltspunkte dienen dazu, einige Gene herauszufiltern, die in weiteren Experimenten genauer untersucht werden müssen.

3.1.1 Qualitätsnachweis der verwendeten RNAs

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 2.2.1.1 auf Seite 26 beschrieben, kultiviert. Um Autophagie zu induzieren, wurden die Zellen sechs Stunden gehungert, indem ihnen als Substrat nur EBSS ange-

¹ In den folgenden Kapiteln wird für die Beschreibung „Abhängigkeit von der POZ-Domäne von Miz1“ die Bezeichnung „Miz1-abhängig“ bzw. „Miz1-unabhängig“ synonym verwendet.

3 Ergebnisse

boten wurde (Kapitel 2.2.1.3 auf Seite 27). Eine Kontrollgruppe wurde sechs Stunden lang weiter mit Vollmedium behandelt. Nachdem die RNA isoliert worden war (Kapitel 2.2.3.9 auf Seite 49), wurde sie DNase verdaut (Kapitel 2.2.3.10 auf Seite 49) und zur Kontrolle ihrer Integrität in einer Gelelektrophorese aufgetrennt.

In Abbildung 3.1 (a)–(b) sind die in der Gelelektrophorese aufgetrennten, aus 3T3 MEFs isolierten RNAs nach DNase-Verdau dargestellt. Die Abbildungen 3.1 (c)–(d) zeigen die aus MEFs^{ARF} isolierten und DNase-verdaute RNAs. Die RNA wurde dann in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.2.3.12 auf Seite 51) und diente als Ausgangspunkt für die weitere Quantifizierung mittels quantitativer Real time PCR (Kapitel 2.2.3.2 auf Seite 33).

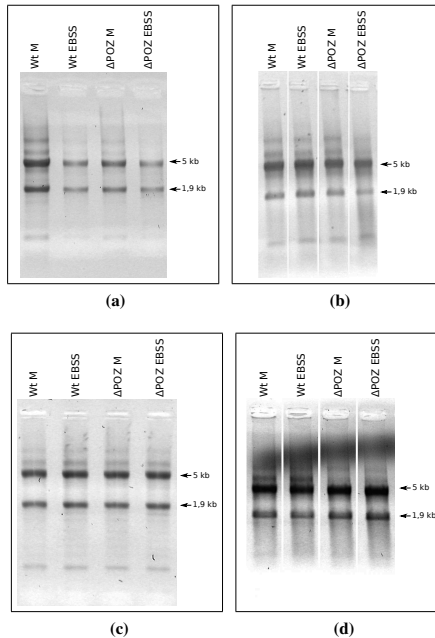


Abbildung 3.1: Aus 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} isolierte und DNase-verdaute RNA. Die RNAs wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Abbildung (a) zeigt die aus 3T3 MEFs isolierte und DNase-verdaute RNA, (b) das biologische Replikate der RNA-Isolierung aus 3T3 MEFs. In Abbildung (c) ist die aus MEFs^{ARF} isolierte und DNase-verdaute RNA dargestellt, (d) zeigt das biologische Replikate der RNA-Isolierung aus MEFs^{ARF}. Die beiden prominenten Banden stellen die ribosomalen RNAs 28s (5 kb) und 18s (1,9 kb) dar. Zwischen den beiden Banden ist kein RNA-Abbau zu erkennen [Bastard et al., 2002]. Die unterschiedliche Breite der Banden ist zum Teil auf schwankende Auftragsmengen zurückzuführen, z.B. Unterschied zwischen Wt M und Wt EBSS in (a). Ebenso wurde in (d) irrtümlicherweise zu viel RNA auf das Gel aufgetragen.

Im Rahmen der Arbeit wurde mehrfach RNA gewonnen und cDNA synthetisiert. Die Wiederholungen der RNA-Isolierungen sind nicht abgebildet. In den folgenden Kapiteln kennzeichnen die

Bezeichnungen „Messung 1“ und „Messung 2“ zwei biologisch unabhängige Versuche. Zum Teil wurde die Expressionsanalyse von Atg9b ein weiteres Mal wiederholt, indem die für Messung 1 eingesetzte cDNA ein weiteres Mal in einer qPCR quantifiziert wurde (Technisches Replikat der 1. Messung). Die Zahlenwerte aller in der qPCR ermittelten Ct Werte, die $\Delta\Delta Ct$ Werte, sowie die Werte der nach der $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Methode berechneten Fold Induction können im Anhang der beiliegenden CD (Ordner Rohdaten der qPCR) entnommen werden. Die Einteilung der untersuchten Gene zu verschiedenen Gruppen, die in den folgenden Kapiteln vorgenommen wird, kann als Übersicht den Tabellen A.1 und A.2 im Anhang entnommen werden.

3.1.2 Genexpressionsanalyse in 3T3 MEFs

3.1.2.1 Nachweis des Knockouts der POZ-Domäne von Miz1 und Induzierbarkeit von Miz1 durch EBSS

Um den Knockout der POZ-Domäne von Miz1 in ΔPOZ Zellen auf Ebene der Genexpression nachzuweisen, wurden zwei verschiedene Primer für die Expressionsanalyse des Gens Miz1 verwendet. Der Primer Miz1-C bindet am C-terminalen Ende von Miz1. Es sollte in Wildtypzellen und in ΔPOZ -Knockout Zellen zu einer vergleichbaren Genexpression kommen, da der C-terminale Bereich von Miz1 unverändert ist. Bei Verwendung des Primers Miz1-N hingegen kann es nur in Wildtypzellen zur Transkription der DNA kommen, da der Primer in ΔPOZ Zellen nicht an die DNA binden kann.

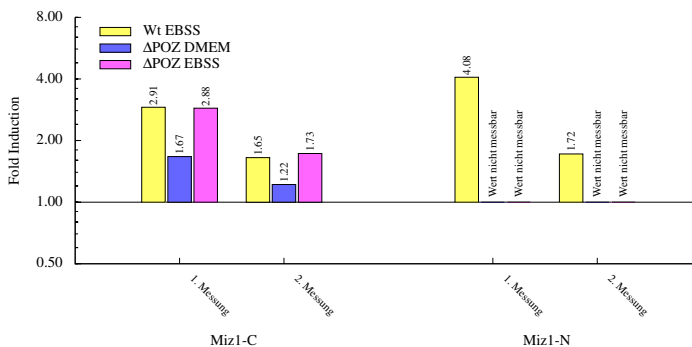


Abbildung 3.2: Expressionsanalyse von Miz1 in 3T3 MEFs mittels qPCR. Darstellung der Genexpressionen als ein Vielfaches der Genexpression in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen. Es wurden Primer verwendet, die am C-terminalen oder am N-terminalen Ende von Miz1 binden. Erwartungsgemäß war bei Verwendung des Primers Miz1-N in ΔPOZ Zellen keine Genexpression messbar.

Abbildung 3.2 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Miz1 in 3T3 MEFs. Es ist zu sehen, dass bei Verwendung des Primers Miz1-C sowohl in Wildtyp- als auch in ΔPOZ -Knockout MEFs die Expression von Miz1 nachzuweisen war. Bei der Analyse mit dem Primer Miz1-N war

die Genexpression in Δ POZ Zellen kaum messbar, was den korrekten Knockout der POZ-Domäne dokumentiert. Weiterhin ist zu sehen, dass die Genexpression von Miz1 in Wildtypzellen nach Inkubation mit EBSS mindestens 1,5fach erhöht war im Vergleich zu nicht hungernden Wildtypzellen. Auch in Δ POZ Zellen war eine Induktion der Genexpression des trunkierten Miz1 nach Aminosäureentzug zu sehen. Dies ist ein Hinweis dafür, dass der Transkriptionsfaktor Miz1 nach Stimulation zu Autophagie durch Aminosäureentzug induziert wird. Erwartungsgemäß war in Δ POZ-Knockout Zellen bei Verwendung des N-terminalen Primers kein Signal unter Hungerbedingungen meßbar.

3.1.2.2 Einfluss der Miz1 POZ-Domäne auf die Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene

Um den Einfluss der POZ-Domäne von Miz1 auf die Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene zu untersuchen, wurde die Genexpression dieser Gene in Wildtypzellen mit deren Genexpression in Δ POZ-Knockout Zellen verglichen. Es wurden die Genexpressionen von 17 Autophagiegenen sowie von Myc in mit Vollmedium kultivierten Wildtypzellen gemessen und in Beziehung gesetzt zu den Expressionen der mit Vollmedium inkubierten Δ POZ-Knockout Zellen.

Bei der Auswertung wurde ein oberer und ein unterer Schwellwert für die fold induction der Genexpressionen festgelegt, anhand derer die Einteilung der Gene in 3 Gruppen erfolgte (siehe hierfür auch Kapitel 2.2.3.2 auf Seite 33). Der obere Schwellwert wurde auf die 1,5fache Genexpression der in Wildtypzellen ermittelten Genexpression festgelegt. Entsprechend lag der untere Schwellwert bei der 0,67fachen Genexpression. Im Folgenden wird für die Beschreibung „Abhängigkeit von der POZ-Domäne von Miz1“ die Bezeichnung „Miz1-abhängig bzw. -unabhängig“ synonym gebraucht.

Die Abbildungen 3.3, 3.4 und 3.5 auf den Seiten 60ff zeigen die Genexpressionen der in Vollmedium kultivierten Δ POZ-Knockout Zellen als ein Vielfaches der Genexpressionen der in Vollmedium kultivierten Wildtypzellen.

Abbildung 3.3 auf Seite 60 zeigt die Gene, deren Expression in Knockout Zellen nicht stark von der Expression in Wildtypzellen abwich (Gruppe 3T3 1-1). Die Expression dieser Gene befand sich in Δ POZ-Knockout Zellen zwischen dem oberen und unteren Schwellwert, d. h. sie war kleiner als die 1,5fache und größer als die 0,67fache Genexpression der in Wildtypzellen gemessenen Genexpression. Zu Gruppe 3T3 1-1 gehören die Gene ULK1, ULK2, Atg4a, Atg4b, Atg5, Atg7, Atg9a, Atg12 und Atg16L1. Sie wurden in mit DMEM kultivierten 3T3 MEFs unabhängig von der POZ-Domäne von Miz1 exprimiert.

Abbildung 3.4 auf Seite 60 zeigt die Gene, deren Expression sich in Δ POZ-Knockout Zellen in einem Experiment ebenfalls zwischen den beiden Schwellwerten befand, im anderen Experiment jedoch den Schwellwert überstieg oder unterschritt (Gruppe 3T3 1-2). Für diese Gene konnte im Rahmen dieser Arbeit keine eindeutige Aussage über ihre Abhängigkeit von der POZ-Domäne von Miz1 getroffen werden. Sie sind als potentiell Miz1 abhängig einzustufen. Es handelt sich um die Gene Atg3, LC3a, LC3b, Atg10 und Myc. Ebenfalls zu dieser Gruppe wurde Atg9b gerechnet, da sich die Expression von Atg9b in den drei Messwiederholungen nicht gleichsinnig verhielt. In zwei Messungen betrug die Expression in Δ POZ Zellen weniger als die 0,67fache Genexpression der

3 Ergebnisse

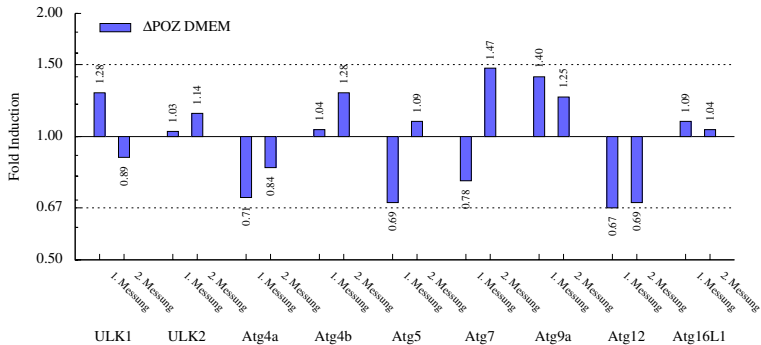


Abbildung 3.3: In 3T3 MEFs Miz1-unabhängig exprimierte Gene (3T3 1-1). Die abgebildeten Gene zeigten in 3T3 MEFs bei Kultivierung in Vollmedium eine von der POZ-Domäne von Miz1 unabhängige Expression. Dargestellt sind die mittels qPCR ermittelten Genexpressionen in Wildtyp- und ΔPOZ-Knockout 3T3 MEFs unter DMEM-Bedingungen. Die Genexpressionen in ΔPOZ-Knockout Zellen sind als die n-fache Genexpression der in Wildtypzellen gemessenen Genexpression dargestellt.

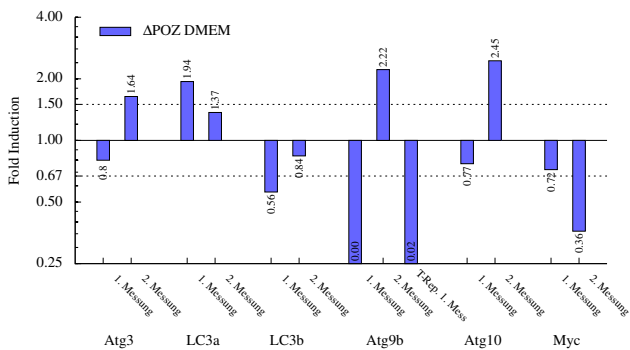


Abbildung 3.4: Gene, für deren Expression in 3T3 MEFs die Miz1-Abhängigkeit unbestimmt ist (3T3 1-2). Dargestellt sind die Gene, deren Abhängigkeit von der POZ-Domäne von Miz1 bei Kultivierung in Vollmedium nicht eindeutig bestimmbar war. Die Genexpressionen wurden mittels qPCR in Wildtyp und ΔPOZ-Knockout Zellen von 3T3 MEFs unter DMEM-Bedingungen gemessen. Die Genexpressionen in ΔPOZ-Knockout Zellen sind als n-fache Genexpression der in Wildtypzellen gemessenen dargestellt. Für Atg9b wurde ein technisches Replikat der 1. Messung durchgeführt.

3 Ergebnisse

Wildtypzellen und in einer mehr als die 1,5fache Expression. Für dieses Gen konnte eine eventuelle Abhängigkeit der Genexpression von der POZ-Domäne von Miz1 ebenfalls nicht eindeutig geklärt werden. Erwähnenswert ist außerdem, dass die Gene LC3a, LC3b und Myc zumindest gleiche Tendenzen in ihren Genexpressionen aufwiesen. Möglicherweise besteht auch bei diesen Genen eine Miz1-Abhängigkeit, die im Rahmen dieser Experimente aber nicht schlüssig nachweisbar war.

Eine von der POZ-Domäne von Miz1 abhängige Expression zeigten die Gene Atg4c, Atg4d und Atg16L2 (Abbildung 3.5, Gruppe 3T3 1-3). Die Expression dieser Gene betrug in Δ POZ-Knockout Zellen in beiden Messungen mehr als die 1,5fache Genexpression der in Wildtypzellen gemessenen oder betrug in beiden Messwiederholungen weniger als die 0,67fache Genexpression der Wildtypzellen. Die Expression von Atg4c und Atg4d wurde nach Knockout der POZ-Domäne in mit DMEM kultivierten 3T3 MEFs reprimiert, die Expression von Atg16L2 wurde induziert.

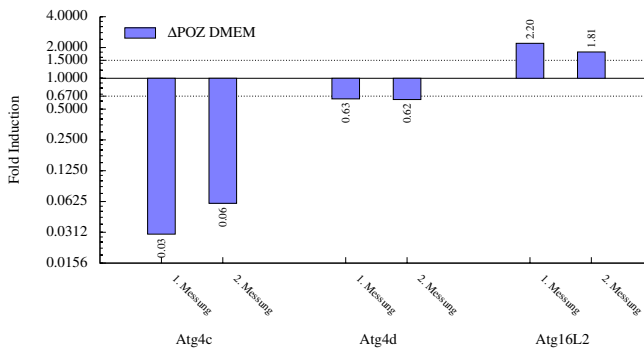


Abbildung 3.5: In 3T3 MEFs Miz1-abhängig exprimierte Gene (3T3 1-3). Die abgebildeten Gene zeigten in 3T3 MEFs bei Kultivierung in Vollmedium eine von der POZ-Domäne von Miz1 abhängige Expression. Dargestellt sind die Genexpressionen in Δ POZ-Knockout Zellen als die n-fache Genexpression der in Wildtypzellen gemessenen Genexpressionen jeweils unter DMEM-Bedingungen. Die Expression dieser Gene lag in beiden Messungen entweder über der 1,5fachen oder unter der 0,67fachen Genexpression der Vergleichszellen. Ermittlung der Genexpressionen mittels qPCR-Analyse.

3.1.2.3 Regulation der Genexpression durch EBSS und Einfluss der POZ-Domäne von Miz1

Der Entzug von Aminosäuren ist ein klassischer Stimulus für Zellen zur Autophagie [Liao et al., 2008]. Es sollte daher untersucht werden, ob die Expression der ausgewählten Gene durch Inkubation mit AS-armem Medium induzierbar ist. Hierfür wurden die Genexpressionen in gehungerten Zellen mit den Genexpressionen in mit DMEM inkubierten Zellen verglichen. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 2.2.1.3 auf Seite 27 beschrieben, für 6 Stunden mit EBSS inkubiert und so zur Autophagie stimuliert. Dann erfolgte die RNA-Isolierung. Als Kontrollgruppe wurden Zellen des gleichen Zelltyps für 6 Stunden mit DMEM inkubiert und anschließend ebenfalls RNA isoliert.

3 Ergebnisse

Gene wurden als nicht durch EBSS reguliert betrachtet, wenn ihre Expression nach AS-Entzug unter der 1,5fachen bzw. über der 0,67fachen Genexpression der nicht-gehungerten Zellen lag. Die Schwellwerte, anhand derer die Einteilung erfolgte, wurden also analog zur Einteilung der Miz1-Abhängigkeit unter normaler basaler Autophagie festgelegt (siehe Kapitel 2.2.3.2 auf Seite 33). Die Expression der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen wurde auf die Expression der mit DMEM inkubierten Wildtypzellen normiert. Das bedeutet, dass die Expression der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen als die n-fache Expression der mit DMEM inkubierten Zellen angegeben wird. Entsprechendes gilt für Δ POZ Zellen. Die Expression der mit EBSS inkubierten Δ POZ Zellen ist auf die Expression der mit DMEM inkubierten Δ POZ Zellen normiert und als die n-fache Expression dieser dargestellt.

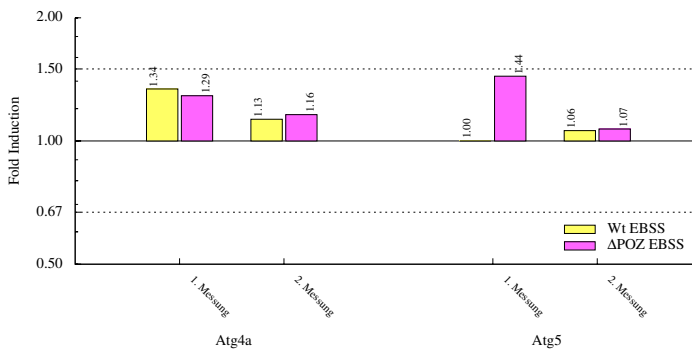


Abbildung 3.6: In 3T3 MEFs nicht durch EBSS regulierte Gene (3T3 2-1). Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen (gelb) sind auf die Expressionen in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Δ POZ Zellen (rosa) sind analog auf die Expressionen in Δ POZ Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Expressionen von Atg4a und Atg5 stiegen in Wildtypzellen nach Inkubation mit EBSS nicht auf mehr als das 1,5fache der Genexpressionen in den mit DMEM inkubierten Vergleichszellen an. Die Expressionen in mit EBSS inkubierten Δ POZ MEFs stiegen ebenfalls auf weniger als das 1,5fache der mit DMEM inkubierten Δ POZ Zellen. Die Gene Atg4a und Atg5 unterlagen in 3T3 MEFs keiner Regulation durch EBSS.

Abbildung 3.6 zeigt die Gene, die nicht durch EBSS reguliert wurden (Gruppe 3T3 2-1). Die Genexpression dieser Gene wich in beiden Messungen nach Inkubation mit EBSS sowohl in Wildtyp- als auch in Δ POZ-Knockout Zellen nicht über die festgelegten Grenzen ab. Dies traf für die Gene Atg4a und Atg5 zu.

Für die Gene Atg3, Atg4b, Atg4d und Myc lieferten die beiden Messungen keine eindeutigen Ergebnisse (Abbildung 3.7 auf Seite 63). In der einen Messung lag der Wert der Fold Induction der gehungerten Zellen (Wildtyp und Δ POZ) innerhalb der beiden Schwellwerte, in der anderen Messung war er mindestens in einem der gehungerten Zelltypen grösser bzw. kleiner. Da für diese

3 Ergebnisse

Gene nicht eindeutig bestimmt werden konnte, ob ihre Genexpression durch AS-Entzug reguliert wird, wurden sie in einer Gruppe (3T3 2-2) zusammengefasst.

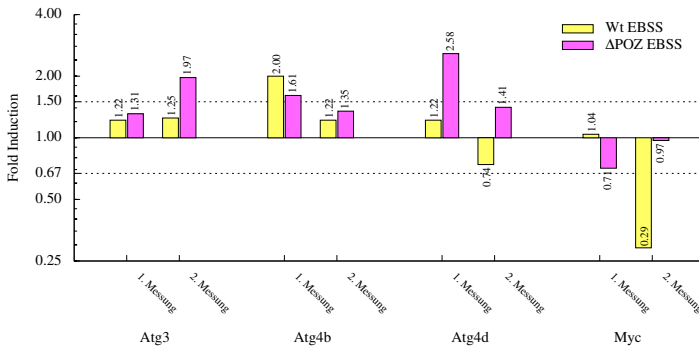


Abbildung 3.7: Gene, für deren Expression in 3T3 MEFs eine Regulation durch EBSS unbestimmt ist (3T3 2-2). Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen (gelb) sind auf die Expressionen in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (magenta) sind analog auf die Expressionen in ΔPOZ Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Nach Stimulation zu Autophagie durch Inkubation mit EBSS stieg in einer Messung die Genexpression in Wildtyp- oder ΔPOZ Zellen in Bezug zu ihrer mit Vollmedium inkubierten Bezugzelle auf mehr als das 1,5fache an bzw. fiel auf weniger als das 0,67fache ab, in der anderen Messung war jedoch keine signifikante Änderung der Genexpression zu verzeichnen.

Abbildung 3.9 auf Seite 65 und Abbildung 3.10 auf Seite 66 zeigen die Gene, die abhängig von EBSS exprimiert wurden. Um zu überprüfen, ob das Vorhandensein der POZ-Domäne von Miz1 einen Einfluß auf die Regulation durch EBSS hat, wurden die Gene, bei denen festgestellt wurde, dass ihre Expression einer Regulation durch EBSS unterliegt, weiter aufgeteilt, je nachdem ob sie Miz1-abhängig oder -unabhängig durch EBSS reguliert wurden. Im Folgenden wird für die Beschreibung „Abhängigkeit der Regulation von der POZ-Domäne von Miz1“ die Bezeichnung „Miz1-abhängige bzw. -unabhängige Regulation“ synonym gebraucht.

Das Schema in Abbildung 3.8 auf Seite 64 zeigt die Kriterien, anhand derer die Einteilung erfolgte. Die Gene wurden als durch EBSS reguliert betrachtet, wenn ihre Expression in gehungerten Zellen mehr als das 1,5fache bzw. weniger als das 0,67fache der unter Vollmedium-Bedingungen inkubierten Zellen betrug. In die durch EBSS regulierten Gruppen wurden nun die Gene eingeteilt, deren Genexpressionen in beiden Messungen nach der Stimulation durch EBSS zumindest in einem der beiden Zelltypen Wildtyp oder ΔPOZ die Grenzwerte überschritt. Gene, für die dies zutraf, wurden weiter eingeteilt, je nachdem, ob Miz1 einen Einfluß auf die Regulation durch EBSS hat. Hierfür wurde die Differenz Δ herangezogen, die den Unterschied der durch EBSS bewirkten Genexpressionsänderung zwischen Wildtyp und ΔPOZ-Knockout Zellen widerspiegelt. Sie ergibt sich durch Subtraktion der $\Delta\Delta Ct$ Werte von *Wt EBSS* und *ΔPOZ EBSS* und ist definiert als der Betrag

3 Ergebnisse

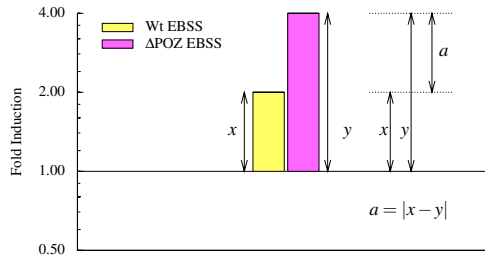


Abbildung 3.8: Schema für die Einteilung der durch EBSS regulierten Gene. Durch Subtraktion der $\Delta\Delta Ct$ Werte der mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen von den mit EBSS inkubierten Wildtypzellen ergibt sich die Differenz a . Sie spiegelt den Unterschied der durch EBSS bewirkten Genexpressionsänderung zwischen Wildtyp und ΔPOZ -Knockout Zellen wider. Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen (gelb) sind dabei auf die Expressionen in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n -fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (magenta) sind analog auf die Expressionen in ΔPOZ Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n -fachen Genexpressionen dieser dargestellt.

dieser Differenz. Beträgt a weniger als 0,585, wird die Expression dieses Gens Miz1-unabhängig durch EBSS reguliert (Gruppe 3T3 2-3); ist a grösser als 0,585, wird das Gen Miz1-abhängig durch EBSS reguliert (Gruppe 3T3 2-5). Eine Änderung um 0,585 in den $\Delta\Delta Ct$ Werten ist gleichbedeutend damit, dass die Genexpression in gehungerten ΔPOZ MEFs auf mindestens das 1,5fache erhöht bzw. auf weniger als das 0,67fache der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen erniedrigt ist.

Da es nicht möglich war, jedes Gen eindeutig in eine der beiden genannten Gruppen einzuteilen, wurde eine dritte Gruppe definiert, in der die Gene eingeteilt wurden, für die die Messwerte heterogen waren (Gruppe 3T3 2-4). So war bei diesen Genen die Differenz a in der einen Messung grösser und in der anderen kleiner als der Grenzwert. Ebenso in diese Gruppe wurden Gene eingeteilt, für die a zwar in beiden Messungen grösser als der Grenzwert war, in einer Messung jedoch anzeigte, dass der durch EBSS bewirkte Expressionsanstieg in Wildtypzellen grösser und in der anderen Messung, dass der Expressionsanstieg in ΔPOZ -Knockout Zellen grösser war.

Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Einteilung erfolgte die Zuordnung der durch EBSS regulierten Gene in 3 Gruppen. Die Gene ULK2, Atg4c, Atg7, LC3b und Atg12 zählen zu den Genen, deren Expression Miz1-unabhängig durch EBSS reguliert wurde (Abbildung 3.9 auf Seite 65, Gruppe 3T3 2-3). Die Inkubation mit EBSS bewirkte sowohl in Wildtypzellen als auch in ΔPOZ -Knockout Zellen eine vergleichbare Zunahme der Genexpression. Der Unterschied der Genexpressionszunahme betrug weniger als 0,585 in den $\Delta\Delta Ct$ Werten. Die Stimulation zu Autophagie bewirkte folglich eine Induktion der Genexpression, die unabhängig vom Vorhandensein der POZ-Domäne von Miz1 war.

3 Ergebnisse

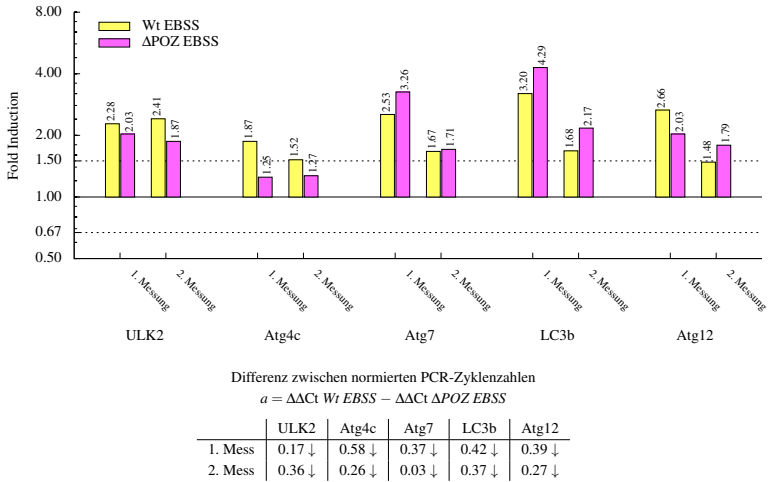
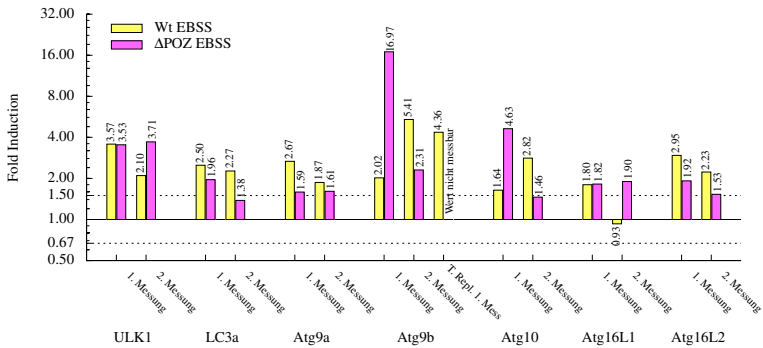


Abbildung 3.9: Miz1-unabhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in 3T3 MEFs (3T3 2-3). Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen (gelb) sind auf die Expressionen in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (magenta) sind analog auf die Expressionen in ΔPOZ Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Inkubation mit EBSS bewirkte eine Induktion der Expression der abgebildeten Gene, die unabhängig vom Vorhandensein der POZ-Domäne von Miz1 war. In der Tabelle kennzeichnen nach unten zeigende Pfeile Werte kleiner 0,585.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse der Gene ULK1, LC3a, Atg9a, Atg16L1 und Atg16L2 waren heterogen. Diese Gene wurden in die Gruppe eingeteilt, für die eine Miz1-Abhängigkeit der Regulation durch EBSS nicht eindeutig zu bestimmen war (Abbildung 3.10 auf Seite 66, Gruppe 3T3 2-4). Ebenfalls in diese Gruppe wurde Atg10 eingeteilt, da die Ergebnisse der 1. Messung andeuteten, dass die Expression von Atg10 nach Knockout der POZ-Domäne von Miz1 bei Inkubation mit EBSS induziert wurde, wohingegen die 2. Messung eine Abnahme der Genexpression in ΔPOZ-Knockout Zellen nach Inkubation mit EBSS im Vergleich zu Wildtypzellen anzeigte. Aus dem gleichen Grund wurde auch Atg9b dieser Gruppe zugeordnet. Für Atg9b waren die Ergebnisse der drei Messungen ebenfalls nicht konsistent. Eine eindeutige Miz1-abhängige Regulation durch EBSS konnte für keines der untersuchten Gene festgestellt werden (Gruppe 3T3 2-5).

3 Ergebnisse



Differenz zwischen normierten PCR-Zykluszahlen
 $a = \Delta\Delta Ct \text{ Wt EBSS} - \Delta\Delta Ct \text{ } \Delta\text{POZ EBSS}$

	ULK1	LC3a	Atg9a	Atg9b	Atg10	Atg16L1	Atg16L2
1. Mess	0.01 ↓	0.35 ↓	0.74 ↑	3.07 ↑	1.50 ↑	0.02 ↓	0.62 ↑
2. Mess	0.82 ↑	0.72 ↑	0.22 ↓	1.23 ↑	0.95 ↑	1.02 ↑	0.55 ↓
T. Repl. 1. Mess.				n.m. ↑			

Abbildung 3.10: Unbestimmte Miz1-Abhängigkeit der Regulation durch EBSS in 3T3 MEFs (3T3 2-4). Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen (gelb) sind auf die Expressionen in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (magenta) sind analog auf die Expressionen in ΔPOZ Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Genexpressionen der dargestellten Gene wurden in 3T3 MEFs durch EBSS reguliert, eine Abhängigkeit vom Vorhandensein der POZ-Domäne von Miz1 konnte anhand der vorliegenden Messdaten nicht eindeutig geklärt werden. In der Tabelle kennzeichnen nach unten zeigende Pfeile Werte kleiner 0,585, nach oben zeigende kennzeichnen Werte grösser 0,585.

3.1.3 Genexpressionsanalyse in p19^{ARF} shRNA immortalisierten MEFs

3.1.3.1 Nachweis des Knockouts der POZ-Domäne von Miz1 und Induzierbarkeit von Miz1 durch EBSS

MEFs^{ARF} wurden über einen Knockdown von p19^{ARF} mit Hilfe einer shRNA immortalisiert (Kapitel 2.1.6 auf Seite 25). Die Kontrolle des Miz1-Knockouts in ΔPOZ MEFs^{ARF} wurde analog zum Vorgehen bei 3T3 MEFs durch die Expressionsanalyse des Gens Miz1 mit einem am C-terminalen und einem am N-terminalen Ende von Miz1 bindenden Primer durchgeführt. Zum Vorgehen siehe auch Kapitel 3.1.2.1 auf Seite 58.

Abbildung 3.11 auf Seite 67 zeigt die graphische Darstellung der Genexpression von Miz1 in MEFs^{ARF}. Bei Verwendung des N-terminalen Primers war in ΔPOZ -Knockout Zellen nahezu keine Genexpression messbar. Die Messung mit dem C-terminal bindenden Primer zeigte, dass Miz1 sowohl in Wildtyp- als auch in Knockout Zellen exprimiert wurde. Diese Ergebnisse dokumentieren den erfolgreichen Knockout der POZ-Domäne in ΔPOZ MEFs^{ARF}.

3 Ergebnisse

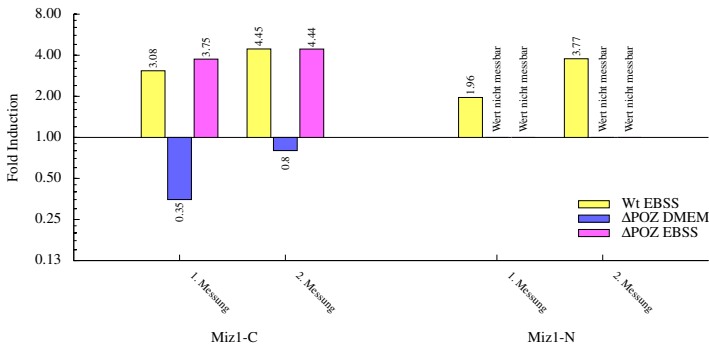


Abbildung 3.11: Expressionsanalyse von Miz1 in MEFs^{ARF} mittels qPCR. Es wurden Primer verwendet, die am C-terminalen oder am N-terminalen Ende von Miz1 binden. Darstellung der Genexpressionen als ein Vielfaches der Genexpression in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen. Erwartungsgemäß war bei Verwendung des Primers Miz1-N in ΔPOZ Zellen keine Genexpression messbar.

Ähnlich wie bei der Genexpressionsanalyse in 3T3 MEFs war auch in Wildtyp MEFs^{ARF} eine Zunahme der Expression von Miz1 unter Hungerbedingungen zu verzeichnen. Sowohl die Messungen mit dem Primer Miz1-C als auch mit dem Primer Miz1-N zeigten, dass die Genexpression von Miz1 in mit EBSS inkubierten Wildtypzellen grösser als die 1,5fache Genexpression derselben Zellen unter DMEM-Bedingungen war. Gleiches gilt auch für ΔPOZ Zellen bei Verwendung des Primers Miz1-C. Das heißt, die Expression von Miz1 wird in MEFs^{ARF} durch EBSS induziert.

Auffällig ist, dass Miz1 unter DMEM-Bedingungen in ΔPOZ MEFs^{ARF} deutlich schwächer exprimiert wurde als in Wildtyp MEFs^{ARF}. Im Gegensatz dazu wurde Miz1 in ΔPOZ 3T3 MEFs stärker exprimiert als in Wildtyp 3T3 MEFs (siehe Kapitel 3.1.2.1 auf Seite 58).

3.1.3.2 Einfluss der Miz1 POZ-Domäne auf die Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene

Entsprechend dem Vorgehen bei 3T3 MEFs wurde auch für MEFs^{ARF} untersucht, ob der Knockout der POZ-Domäne von Miz1 einen Einfluss auf die Genexpression hat, wenn die Zellen in DMEM, also unter normalen Kulturbedingungen, inkubiert werden. Die Gene wurden ebenfalls in drei Gruppen eingeteilt, wobei die gleichen Schwellwerte wie bei der Auswertung der Miz1-Abhängigkeit der Genexpression in 3T3 MEFs verwendet wurden (siehe Kapitel 3.1.2.2 auf Seite 59).

Die Abbildungen 3.12, 3.13 und 3.14 auf Seite 68ff zeigen die graphische Darstellung der Genexpressionen in Wildtyp MEFs^{ARF} und ΔPOZ-Knockout MEFs^{ARF} nach Inkubation mit DMEM. Zu Gruppe ARF 1-1 gehören die Gene ULK2, Atg3, Atg4b, Atg7, LC3a, LC3b, Atg9a und Atg12 (Abbildung 3.12 auf Seite 68). Die Expression dieser Gene betrug in ΔPOZ-Knockout Zellen weni-

3 Ergebnisse

ger als das 1,5fache und mehr als das 0,67fache der Expression in Wildtypzellen und zeigte damit keine Abhängigkeit von der POZ-Domäne von Miz1.

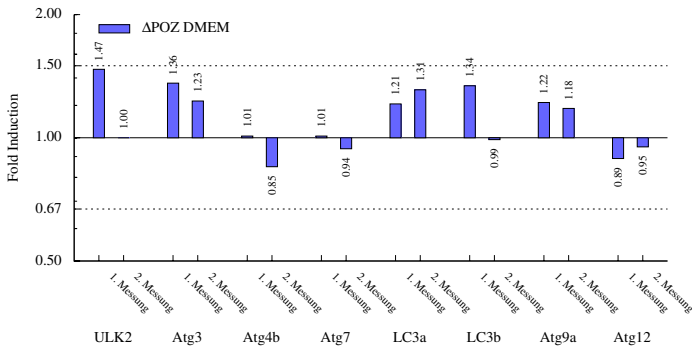


Abbildung 3.12: In MEFs^{ARF} Miz1-unabhängig exprimierte Gene (*ARF* 1-1). Darstellung der Genexpressionen in Δ POZ-Knockout Zellen als die n-fache Genexpression der in Wildtypzellen gemessenen. Die Genexpressionen der abgebildeten Gene waren in Δ POZ-Knockout Zellen unter DMEM-Bedingungen kleiner als die 1,5fache bzw. grösser als die 0,67fache Genexpression der Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen. Die Expression der dargestellten Gene war unabhängig von der POZ-Domäne von Miz1.

Für die Gene ULK1, Atg4a, Atg4c, Atg4d, Atg10 und Atg16L1 konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob eine Abhängigkeit von der POZ-Domäne von Miz1 besteht. Sie wurden daher der Gruppe *ARF* 1-2 zugeordnet (Abbildung 3.13 auf Seite 69). Die Messwerte der beiden Messungen waren heterogen und unterschieden sich dahingehend, dass der Wert der einen Messung eine Abhängigkeit anzuzeigen schien, während der Wert der anderen Messung innerhalb des Grenzbereichs lag und gegen eine Abhängigkeit sprach. Für das Gen Atg5 konnte eine mögliche Abhängigkeit seiner Expression von Miz1 ebenfalls nicht eindeutig geklärt werden, da die beiden Messungen widersprüchliche Ergebnisse lieferten.

Abbildung 3.14 auf Seite 69 zeigt die Gene Atg9b, Atg16L2 und Myc, die als von der POZ-Domäne von Miz1 abhängig eingestuft wurden (Gruppe *ARF* 1-3). Die Messwerte der Messungen lagen außerhalb des festgelegten Grenzbereichs und waren in jeder Messung gleichsinnig verändert. Dabei führte der Knockout der POZ-Domäne in MEFs^{ARF} zu einer Repression der Expression von Atg9b und Myc, während die Expression von Atg16L2 induziert wurde.

3 Ergebnisse

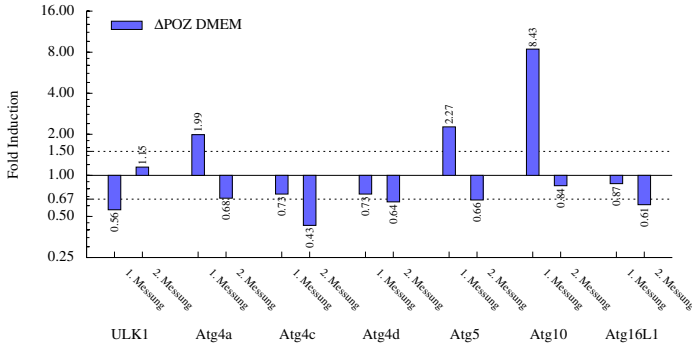


Abbildung 3.13: Gene, für deren Expression in MEFs^{ARF} die Miz1-Abhängigkeit unbestimmt ist (ARF 1-2). Darstellung der Genexpressionen in Δ POZ-Knockout Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert auf die Genexpressionen in Wildtyp DMEM der mittels p19^{ARF} shRNA immortalisierten MEFs. Die Genexpressionen der abgebildeten Gene unterschieden sich in der 1. und 2. Messung, es konnte daher nicht eindeutig geklärt werden, ob der Knockout der POZ-Domäne von Miz1 einen Einfluss auf die Genexpression hat.

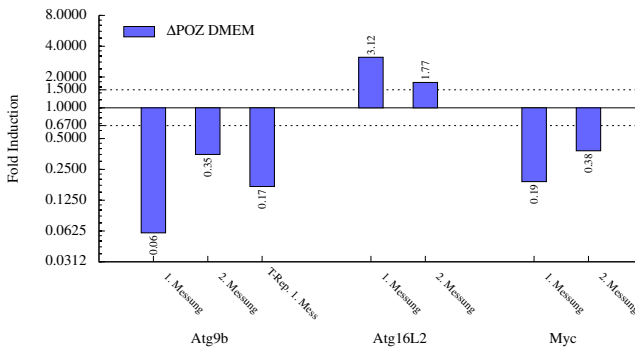


Abbildung 3.14: In MEFs^{ARF} Miz1-abhängig exprimierte Gene (ARF 1-3). Darstellung der Genexpressionen in Δ POZ-Knockout Zellen als die n-fache Genexpression der in Wildtypzellen gemessenen. Für Atg9b wurde ein technisches Replikate der 1. Messung durchgeführt. Die Genexpressionen in Δ POZ-Knockout Zellen unter DMEM-Bedingungen über- oder unterschritten in allen Messungen die Grenzwerte. Die dargestellten Gene wurden in MEFs^{ARF} abhängig von der POZ-Domäne von Miz1 exprimiert.

3.1.3.3 Regulation der Genexpression durch EBSS und Einfluss der POZ-Domäne von Miz1

Auch für MEFs^{ARF} wurde geprüft, ob die Genexpressionen der ausgewählten Gene durch EBSS reguliert wurden. Für die Gene, die eine Regulation durch EBSS erfuhren, wurde weiter untersucht, ob das Vorhandensein der POZ-Domäne von Miz1 einen Einfluss auf diese Regulation hat. Es wurden die gleichen Kriterien für die Einteilung zugrunde gelegt, die bereits für 3T3 MEFs dargestellt wurden (siehe hierzu auch Kapitel 3.1.2.3 auf Seite 61).

Keines der untersuchten Gene wurde eindeutig unabhängig von EBSS exprimiert. Die Expression aller Gene über- bzw. unterschritt in mit EBSS inkubierten Wildtyp- oder Δ POZ Zellen in mindestens einer Messung den Grenzwert. Zu den Genen der Gruppe, für die nicht eindeutig bestimmt werden konnte, ob ihre Expression einer Regulation durch EBSS unterlag, gehören die Gene *Atg3*, *Atg4a*, *Atg4c* und *Atg5* (Abbildung 3.15, Gruppe *ARF* 2-2). Bei diesen Genen lagen die Werte der ersten Expressionsmessung in Wildtyp EBSS und Δ POZ EBSS innerhalb des Grenzbereichs, die Werte der zweiten Messung überschritten die Grenzwerte in beiden Zelltypen.

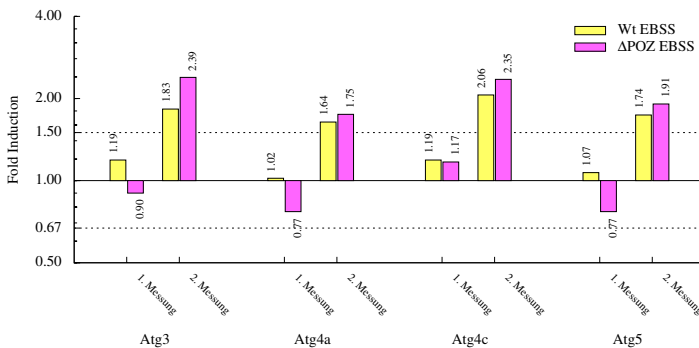


Abbildung 3.15: Gene, für deren Expression in MEFs^{ARF} eine Regulation durch EBSS unbestimmt ist (*ARF* 2-2). Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen (gelb) sind auf die Expressionen in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Δ POZ Zellen (magenta) sind analog auf die Expressionen in Δ POZ Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Inkubation mit EBSS bewirkte in einer Messung in Wildtyp und/oder Δ POZ Zellen eine Induktion der Genexpression über die Schwellwerte. In der anderen Messung löste die Inkubation mit EBSS weder in Wildtyp noch in Δ POZ Zellen eine signifikante Änderung der Genexpression aus.

Die Gene, für die eine Abhängigkeit von EBSS nachgewiesen werden konnte, wurden weiter unterteilt, abhängig davon, ob das Vorhandensein der POZ-Domäne von Miz1 die Regulation durch EBSS beeinflusste oder nicht. Die Kriterien, die der Einteilung zugrundegelegt wurden, zeigt das Schema in Abbildung 3.8 auf Seite 64.

Demnach zeigten die Gene *ULK2*, *Atg4b*, *Atg9a*, *Atg10*, *Atg12* und *Atg16L2* in MEFs^{ARF} eine Miz1-unabhängige Regulation durch EBSS (Abbildung 3.16 auf Seite 71, Gruppe *ARF* 2-3). Die

3 Ergebnisse

Inkubation mit EBSS führte in Wildtyp MEFs^{ARF} und ΔPOZ-Knockout MEFs^{ARF} zu einer Induktion der Genexpression. Der Induktionsanstieg war in beiden Zelltypen vergleichbar², das heißt die Induktion durch EBSS war unabhängig vom Knockout der POZ-Domäne von Miz1.

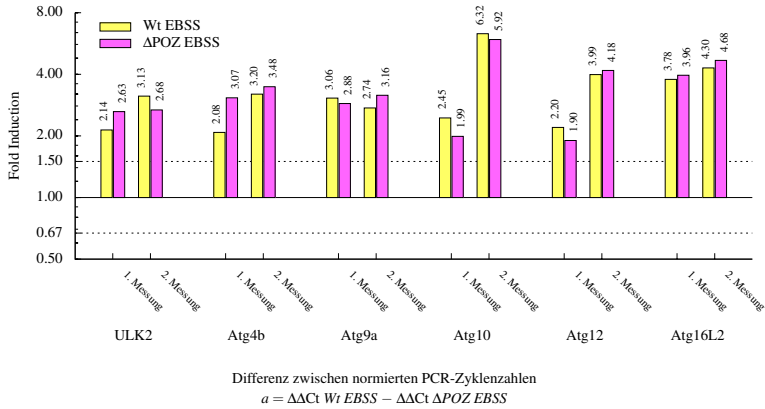


Abbildung 3.16: Miz1-unabhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in MEFs^{ARF} (ARF 2-3). Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen (gelb) sind auf die Expressionen in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (magenta) sind analog auf die Expressionen in ΔPOZ Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Inkubation mit EBSS bewirkte einen Anstieg der Genexpressionen im Vergleich zu den mit Vollmedium inkubierten Vergleichszellen. Der Expressionsanstieg unterschied sich nicht wesentlich zwischen Wildtyp und Knockout Zellen, die Gene wurden unabhängig von der POZ-Domäne von Miz1 durch EBSS reguliert. In der Tabelle kennzeichnen nach unten zeigende Pfeile Werte kleiner 0,585.

Abbildung 3.17 auf Seite 72 zeigt die Gene, für die nicht sicher geklärt werden konnte, ob die Regulation ihrer Genexpression von der POZ-Domäne von Miz1 abhängig war (Gruppe ARF 2-4). Die Daten der beiden Messwiederholungen zeigten widersprüchliche Ergebnisse³ oder zeigten in einer Messung eine durch den Wegfall der POZ-Domäne ausgelöste Zunahme der Induktion durch EBSS an, während die andere Messung eine stärkere Zunahme der Induktion durch EBSS bei Vorhandensein der POZ-Domäne in Wildtypzellen nahelegte.⁴ Ersteres traf für die Gene ULK1, Atg4d, LC3a, LC3b und Atg16L1 zu, Zweiteres für die Gene Atg7 und Atg9b.

Von allen untersuchten Genen wurde nur die Expression von Myc Miz1-abhängig durch EBSS reguliert (Abbildung 3.18 auf Seite 73, Gruppe ARF 2-5).⁵ In Zellen, die die POZ-Domäne von Miz1

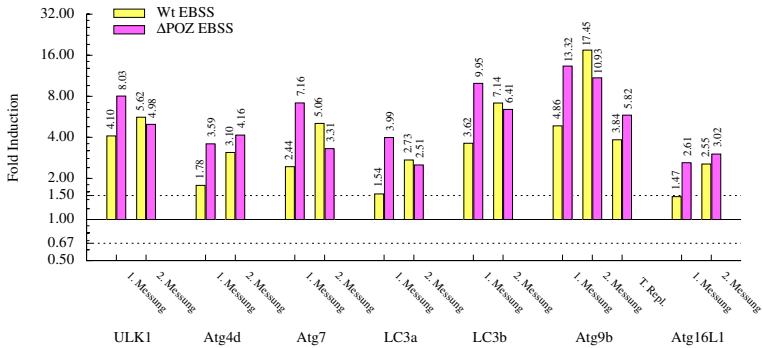
² Das bedeutet für die Differenz aus $\Delta\Delta Ct \text{ Wt EBSS}$ und $\Delta\Delta Ct \Delta POZ EBSS$ galt in beiden Messungen $a_{1/2} < 0,585$.

³ Das bedeutet für die Differenz aus $\Delta\Delta Ct \text{ Wt EBSS}$ und $\Delta\Delta Ct \Delta POZ EBSS$, dass $a_1 < 0,585$, $a_2 > 0,585$.

⁴ Das heißt $a > 0,585$ in beiden Messungen, wobei einmal die Induktion in Wt EBSS ($x_1 > y_1$) und das andere Mal die Induktion in $\Delta POZ EBSS$ ($x_2 < y_2$) stärker war.

⁵ Für die Differenz aus $\Delta\Delta Ct \text{ Wt EBSS}$ und $\Delta\Delta Ct \Delta POZ EBSS$ galt in beiden Messungen $a_{1/2} > 0,585$.

3 Ergebnisse



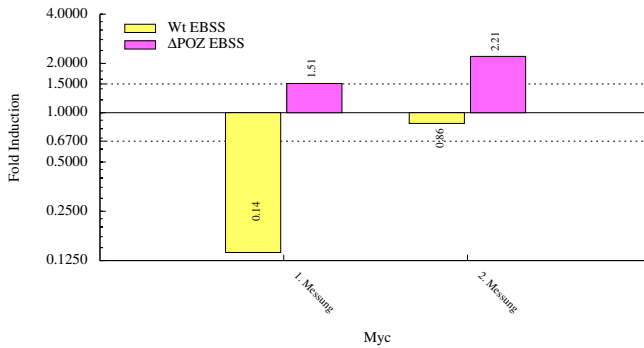
Differenz zwischen normierten PCR-Zykluszahlen
 $a = \Delta\Delta C_t \text{ Wt EBSS} - \Delta\Delta C_t \Delta\text{POZ EBSS}$

	ULK1	Atg4d	Atg7	LC3a	LC3b	Atg9b	Atg16L1
1. Mess	0.97 ↑	1.01 ↑	1.56 ↑	1.38 ↑	1.46 ↑	1.46 ↑	0.83 ↑
2. Mess	0.17 ↓	0.43 ↓	0.61 ↑	0.13 ↓	0.16 ↓	0.67 ↑	0.24 ↓
T. Repl. 1. Messung						0.60 ↑	

Abbildung 3.17: Unbestimmte Miz1-Abhängigkeit der Regulation durch EBSS in MEFs^{ARF} (ARF 2-4). Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen (gelb) sind auf die Expressionen in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (magenta) sind analog auf die Expressionen in ΔPOZ Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Für Atg9b wurde zusätzlich ein technisches Replikat der 1. Messung durchgeführt. Die Genexpressionen der dargestellten Gene wurden in MEFs^{ARF} durch EBSS reguliert, eine Abhängigkeit vom Vorhandensein der POZ-Domäne von Miz1 konnte anhand der vorliegenden Messdaten nicht eindeutig geklärt werden. In der Tabelle kennzeichnende Pfeile Werte kleiner 0,585, nach oben zeigende kennzeichnen Werte grösser 0,585.

enthielten, wurde die Expression von Myc nach Autophagiestimulation herunterreguliert, während in Zellen, denen die POZ-Domäne fehlte, die Expression von Myc induziert wurde.

3 Ergebnisse



Differenz zwischen normierten PCR-Zykluszahlen
 $a = \Delta\Delta Ct \text{ WT EBSS} - \Delta\Delta Ct \text{ } \Delta\text{POZ EBSS}$

	Myc
1. Mess	3.48 ↑
2. Mess	1.37 ↑

Abbildung 3.18: Miz1-abhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in MEFs^{ARF} (ARF 2-5). Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten Wildtypzellen (gelb) sind auf die Expressionen in Wildtypzellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Die Genexpressionen der mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (magenta) sind analog auf die Expressionen in ΔPOZ Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als die n-fachen Genexpressionen dieser dargestellt. Myc zeigte eine von der POZ-Domäne von Miz1 abhängige Regulation. Die Inkubation mit EBSS, die in Wildtypzellen zu einer Abnahme der Genexpression von Myc führte, bewirkte in Knockout Zellen, denen die POZ-Domäne von Miz1 fehlt, eine Zunahme der Genexpression. In der Tabelle kennzeichnen nach oben zeigende Pfeile Werte größer 0,585.

3.2 Substitution von humanem Miz1 durch retrovirale Infektion

In Kapitel 3.1 auf Seite 56 wurde die Expression der ausgewählten Gene in 3T3 MEFs und in MEFs^{ARF} untersucht. Die Genexpressionen in Wildtypzellen wurden mit denen in ΔPOZ-Knockout Zellen verglichen. Ein Nachteil des Vergleichs von Wildtyp- und Knockout Zellen ist, dass die Zellen zu unterschiedlichen Zelllinien gehören. Es ist daher nicht auszuschließen, dass Unterschiede in den Messungen auf Mutationen beruhen, die spontan in einer Zelllinie entstanden sind. Der Vergleich der Genexpression in Wildtypzellen mit derjenigen in Knockout Zellen ist daher mit einiger Unsicherheit behaftet. Um das Problem der unterschiedlichen Zelllinien zu umgehen und damit eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde humanes Miz1 über eine retrovirale Infektion in ΔPOZ-Knockout Zellen eingebracht. Auf diese Weise können die Veränderungen, die durch das Fehlen der POZ-Domäne hervorgerufen werden, ausgehend von einer einzigen Zelllinie untersucht werden.

Die Infektion von ΔPOZ Zellen mit dem pBABE-Virus erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.4 auf Seite 28 beschrieben. Durch die Infektion mit pB-Miz1 wurde ein Expressionsvektor für humanes Miz1 in

die Zellen eingebracht. Humanes Miz1 besteht aus 803 Aminosäuren und weist auf Proteinebene eine 92%ige Homologie zu murinem Miz1 auf [Peukert et al., 1997]. Als Vergleichszellen wurden Δ POZ Zellen mit einem Leervektor (pB- \emptyset) infiziert, der nicht für Miz1 kodiert. Der Erfolg der Infektion konnte durch die Infektion mit pBABE H2B-GFP nachgewiesen werden (Kapitel 2.2.1.5 auf Seite 29). Die Infektionseffizienz wurde durch Auszählen der grün fluoreszierenden Zellkerne unter dem Mikroskop ermittelt und betrug im ersten Experiment der Infektion von 3T3 MEFs 14,8 % und im zweiten 14,0 %. Bei infizierten Δ POZ 3T3 MEFs erfolgte in jedem Experiment eine Puromycin-Selektion, bei MEFs^{ARF} war eine Selektion mit Hilfe von Puromycin nicht möglich (Kapitel 2.2.1.4 auf Seite 28). Da bei diesen Zellen eine transiente Infektion erfolgte, ist nicht sicher, wieviele Zellen zum Zeitpunkt des Experiments mit dem pBABE Vektor substituiert waren.

Ein Teil der Zellen wurde dann durch Inkubation mit EBSS zu Autophagie stimuliert, während ein weiterer Teil für die gleiche Zeit mit DMEM inkubiert wurde (Kapitel 2.2.1.3 auf Seite 27). Je nach Versuchsaufbau wurde dann für die qPCR RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, Gesamtzelllysate für die Proteinanalyse gewonnen oder Fixierungen für die Elektronenmikroskopie vorgenommen.

Es wurden zwei unabhängige Infektionen von 3T3 MEFs durchgeführt (Experiment 1 und 2). In Experiment 3 erfolgte keine neue Infektion der Zellen, sondern es wurden die Zellen einer Zellschale aus dem zweiten Experiment nach erfolgter Selektion so lange weiter kultiviert und neu ausgesät, bis erneut ausreichend viele Zellen für ein weiteres Experiment zur Verfügung standen (Experiment 3). Δ POZ MEFs^{ARF} wurden nur einmal mit den Vektor-tragenden Viren infiziert (Experiment 1).

3.2.1 Nachweis der Miz1-Substitution auf Proteinebene

Um den Erfolg der viralen Infektion nachzuweisen und zu zeigen, dass das humane Miz1 auch auf Proteinebene nachweisbar war, wurde eine Immundetektion für Miz1 durchgeführt. Wie in Kapitel 2.2.4.1 auf Seite 51 beschrieben, wurden Gesamtzelllysate aus acht konfluent gewachsenen Gewebekulturschalen von mit pB-Miz bzw. pB- \emptyset infizierten Δ POZ Zellen hergestellt. In einer SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.4 auf Seite 53) wurden die Proteine aufgetrennt und mit Hilfe eines Westernblots auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (s. Kapitel 2.2.4.5 auf Seite 54). Da sich in früheren Experimenten im Rahmen der Diplomarbeit von Mareike Müller gezeigt hatte, dass der Erstantikörper von Miz1 im Westernblot sehr unspezifisch ist, wurden in der SDS-Gelelektrophorese neben Gesamtzelllysaten auch immunpräzipitiertes Miz1 aufgetrennt (Kapitel 2.2.4.3 auf Seite 52). Die Immundetektion erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.6 auf Seite 55 angegeben.

Die Unterscheidung des humanen, substituierten Miz1 von dem trunkierten, murinen Miz1 der Δ POZ Zellen erfolgte anhand der Größenunterschiede der beiden Proteine. Murines Miz1 ist ein ca. 110 kDa großes Protein, das in der Elektrophorese auf praktisch gleicher Höhe mit dem nur 9 AS längeren, humanen Miz1 läuft. Das trunkierte Miz1 der Δ POZ Zellen läuft in der Elektrophorese schneller, da es um 100 AS kürzer ist als das Wildtyp-Miz1.

Es wurden Immundetektionen von Miz1 in den Experimenten 2 und 3 der Infektion von 3T3 MEFs und für die Infektion von MEFs^{ARF} durchgeführt. Da aus MEFs^{ARF} nur sehr geringe Proteinmengen isoliert werden konnten, konnte die Immundetektion von Miz1 in MEFs^{ARF} nicht erfolg-

3 Ergebnisse

reich durchgeführt werden. Sowohl das trunkierte als auch das humane, substituierte Miz1 konnten in der Immundetektion nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse für MEFs^{ARF} sind aus diesem Grund nicht dargestellt.

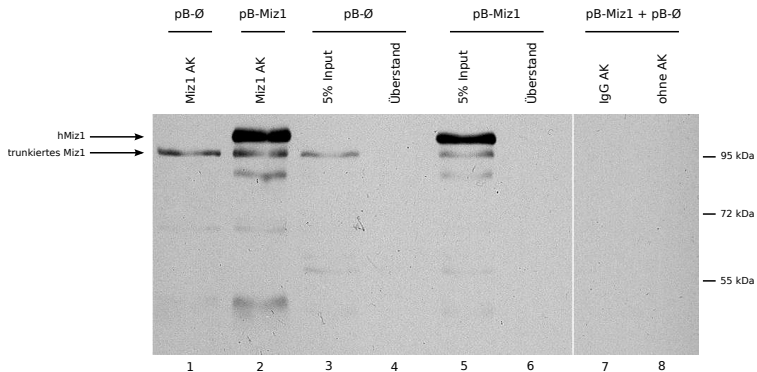


Abbildung 3.19: Immundetektion von Miz1 in mit pB-∅ oder pB-Miz1 infizierten ΔPOZ 3T3 MEFs (Experiment 2 der Infektion von 3T3 MEFs). In mit pB-∅ oder pB-Miz1 infizierten Zellen ist das trunkierte, murine Miz1 sowohl nach der Immunpräzipitation als auch im Gesamtzelllysate als dünne Bande (Spur 1, 2, 3 und 5) nachzuweisen. Das humane, substituierte Miz1 ist in der Immunpräzipitation sowie im Gesamtzelllysate von mit pB-Miz1 infizierten ΔPOZ Zellen als dicke Bande zu erkennen (Spur 2 und 5). Nicht detektiert wurde Miz1 in den Überständen der Proteinlösung nach Miz1-Immunpräzipitation (Spur 4 und 6) sowie in den mit IgG oder ohne AK inkubierten Zelllysaten (Spur 7 und 8). Gelelektrophorese in 8%igem SDS-Gel.

Abbildung 3.19 zeigt das Ergebnis der Immundetektion von Miz1 in den retroviral infizierten ΔPOZ Zellen der 3T3 MEFs. Es handelt sich um das 2. Experiment der Infektion von 3T3 MEFs. Spur 1 und 2 zeigen die Immundetektion des in der Immunpräzipitation aufgereinigten Miz1. Es ist zu erkennen, dass die mit dem Leervektor infizierten Knockout-Zellen (pB-∅) nur das trunkierte Miz1 exprimieren, welches als dünne Bande in Spur 1 zu erkennen ist. Die ΔPOZ-Knockout Zellen, die mit pB-Miz1 infiziert wurden, zeigen neben der Bande des trunkierten Miz1 zusätzlich eine dicke ca. 110 kDa große Bande, die dem humanen substituierten Miz1 entspricht (Spur 2). Da es um 120 AS länger ist als das trunkierte Miz1, läuft es in der Elektrophorese langsamer. Die Bande erscheint deutlich dicker als die des trunkierten Miz1 und spricht für eine Überexpression des humanen Miz1.

Um sicherzustellen, dass Miz1 in der Immunpräzipitation vollständig aus der Gesamtproteinlösung isoliert worden war, wurde der Überstand der Proteinlösung ebenfalls durch eine Immundetektion auf das Vorhandensein von Miz1-Protein untersucht. Wie erwartet ist nach Herausfiltern von Miz1 im Überstand kein Miz1 mehr detektierbar (Spur 4 und 6).

In den Spuren 3 und 5 sind die Immundetektionen der Gesamtzelllysate (5%-Input) zu sehen. Es wurden 5% der für die Immunpräzipitation eingesetzten Protein-Menge aufgetragen. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, erwies sich der Erstantikörper von Miz1 als ausreichend spezifisch, sodass bei der Immundetektion von Miz1 im Gesamtzelllysate keine unspezifischen Banden nachzuweisen

3 Ergebnisse

sind. Das Bandenmuster der mit pB- \emptyset bzw. pB-Miz1 infizierten Knockout-Zellen entsprechen den Ergebnissen der Detektion des präzipitierten Miz1 in den Spuren 1 und 2. In weiteren Immundetektionen wurde daher auf eine Immunpräzipitation von Miz1 verzichtet.

Als Kontrollen wurden die Zelllysate der mit pB- \emptyset oder pB-Miz1 infizierten Zellen mit einem IgG-Antikörper aus Kaninchenserum anstelle des Miz1-Antikörpers bzw. ganz ohne Antikörper inkubiert. Wie in den Spuren 7 und 8 zu sehen ist, wurde hier weder das trunkierte murine Miz1 noch das humane Miz1 detektiert.

Die Immundetektion des 3. Experiments der Infektion von 3T3 MEFs ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Es wurde eine Immundetektion der Gesamtzelllysate von mit pB- \emptyset oder pB-Miz1 in-

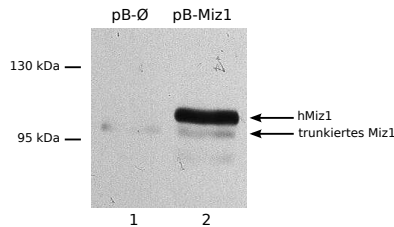


Abbildung 3.20: Immundetektion von Miz1 in mit pB- \emptyset oder pB-Miz1 infizierten Δ POZ-3T3 MEFs (Experiment 3 der Infektion von 3T3 MEFs). Die Immundetektionen wurden in Gesamtzelllysaten der infizierten Δ POZ Zellen durchgeführt. In mit pB- \emptyset infizierten Zellen ist das trunkierte, murine Miz1 als schwache Bande (Spur 1) nachzuweisen. In mit pB-Miz1 infizierten Zellen ist, zusätzlich zum trunkierten Miz1 der Δ POZ Zellen, das humane, substituierte Miz1 als dicke Bande zu erkennen (Spur 2). Gelelektrophorese in 8%igem SDS-Gel.

fizierten Zellen durchgeführt. Auf eine Immunpräzipitation wurde verzichtet. Bei den mit pB- \emptyset infizierten Δ POZ-Knockout Zellen ist in der Immundetektion eine schwache Bande nachzuweisen, die dem trunkierten murinen Miz1 entspricht. Das nicht-trunkierte humane Miz1 ist erwartungsgemäß nicht nachzuweisen (Spur 1). In Spur 2 ist neben dem trunkierten Miz1 auch das etwas größere nicht trunkierte hMiz1, das über die Infektion in die Zellen pB-Miz1 eingebracht wurde, zu erkennen. Aufgrund der Überexpression des humanen Miz1 erscheint die Bande deutlich dicker.

Die Immundetektionen beweisen, dass die mit pB-Miz1 infizierten Knockout Zellen von 3T3 MEFs das humane Miz1 auf Proteinebene überexprimieren.

3.2.2 Einfluss der retroviralen hMiz1-Substitution auf die Genexpression

3.2.2.1 Qualitätsnachweis der verwendeten RNAs

Es wurden Genexpressionsmessungen in mit pB-Miz1 oder pB- \emptyset infizierten Δ POZ Zellen durchgeführt. RNA aus 3T3 MEFs stand aus den Experimenten 1-3 zur Verfügung, RNA aus MEFs^{ARF} wurde nur einmal isoliert. Die RNA wurde wie in Kapitel 2.2.3.9 auf Seite 49 beschrieben isoliert, DNase verdaut (Kapitel 2.2.3.10 auf Seite 49) und in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.2.3.12 auf Seite 51).

Die Abbildungen 3.21 (a)–(c) auf Seite 77 zeigen die RNA aus den Experimenten 1-3 der Infektion von 3T3 MEFs. RNA, die aus infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} isoliert wurde, zeigt Abbildung 3.21 (d).

3 Ergebnisse

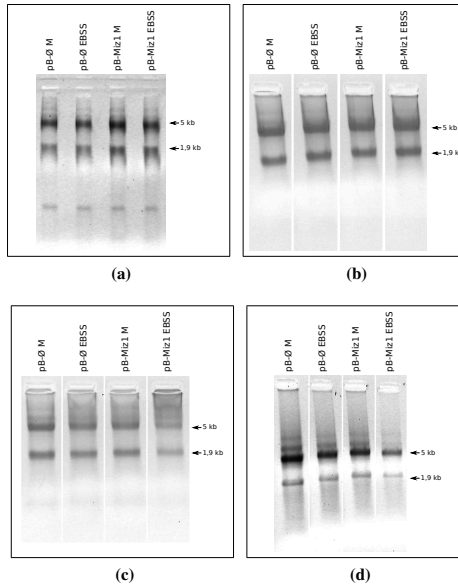


Abbildung 3.21: RNAs, die aus mit pB-Ø und pB-Miz1 infizierten Δ POZ MEFs isoliert wurden. Die RNAs wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. (a) zeigt DNase-verdaute RNA aus Experiment 1 der 3T3 MEFs-Infektion, (b) DNase-verdaute RNA aus Experiment 2 der 3T3 MEFs-Infektion, (c) DNase-verdaute RNA aus Experiment 3 der 3T3 MEFs-Infektion. In Abbildung (d) ist die DNase-verdaute RNA aus der einzigen Infektion von MEFs^{ARF} dargestellt. Die beiden Banden stellen die ribosomalen RNAs 28s (5 kb) und 18s (1,9 kb) dar. Zwischen den beiden Banden ist kein RNA-Abbau zu erkennen [Bastard et al., 2002].

Alle Rohdaten der mittels qPCR ermittelten Werte sind im Ordner „Rohdaten der qPCR“ auf der beiliegenden CD zu finden. Eine Übersicht zu den vorgenommenen Einteilungen der Gene sind den Tabellen A.1 und A.2 im Anhang zu entnehmen.⁶

⁶ In den folgenden Kapiteln wird für die Beschreibung „Abhängigkeit von der POZ-Domäne von Miz1“ die Bezeichnung „Miz1-abhängig“ bzw. „Miz1-unabhängig“ synonym verwendet.

3.2.2.2 Genexpressionsanalyse in mit pB- \emptyset und pB-Miz1 infizierten Δ POZ 3T3 MEFs

3.2.2.2.1 Einfluss von hMiz1 auf die Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene Das Fehlen der POZ-Domäne von Miz1 in Δ POZ-Knockout Zellen führte bei einigen der untersuchten Gene zu einer im Vergleich zu Wildtypzellen veränderten Genexpression. Es wurde nun untersucht, ob die retrovirale Substitution von Miz1 in Δ POZ Zellen unter DMEM-Bedingungen zu einer Änderung der Genexpression im Vergleich zu mit einem Leervektor infizierten Δ POZ Zellen führt.

Abbildung 3.22 auf Seite 79 zeigt die graphischen Darstellungen der Ergebnisse der Genexpressionsmessungen. Es sind die drei durchgeführten Messwiederholungen (Experiment 1-3) und der daraus gebildete Mittelwert dargestellt. Für Atg9b wurde der Mittelwert aus insgesamt sechs Werten berechnet, nämlich aus den Werten der drei biologisch unabhängigen Messungen 1-3 sowie aus je einem technischen Replikat der Messung 1-3. Es erfolgte eine Einteilung analog zum Vorgehen bei nicht-infizierten 3T3 MEFs und MEFs^{ARF}, wobei die gleichen Grenzwerte verwendet wurden (Kapitel 2.2.3.2 auf Seite 33).

Die Mittelwerte der Genexpressionen, die in mit pB-Miz1 infizierten Zellen gemessen wurden, wichen nicht stark von den Genexpressionen der mit dem Leervektor infizierten Zellen ab. Bis auf das Gen Atg3 befanden sich die Mittelwerte der untersuchten Genexpressionen innerhalb der Schwellwerte. Die Expression von Atg3 war in mit pB-Miz1 infizierten Δ POZ Zellen fast 2fach reprimiert im Vergleich zu den mit pB- \emptyset infizierten Δ POZ Zellen. Seine Expression war damit kleiner als der untere Grenzwert. Unter Berücksichtigung der gewählten Einteilungskriterien ist festzustellen, dass die Expression von Atg3 in Δ POZ 3T3 MEFs durch die retrovirale Substitution von humanem Miz1 reprimiert wurde (Gruppe *Inf3T3* 1-3). Allerdings ist dieses Ergebnis aufgrund der großen Schwankungen innerhalb der drei Messungen unsicher. Da der Schwellwert innerhalb der Standardabweichung liegt, ist es auch möglich, dass die hier festgestellte Abhängigkeit nicht besteht. Die übrigen untersuchten Gene zeigten eine von humanem Miz1 und damit von der POZ-Domäne unabhängige Genexpression (Gruppe *Inf3T3* 1-1).

3 Ergebnisse

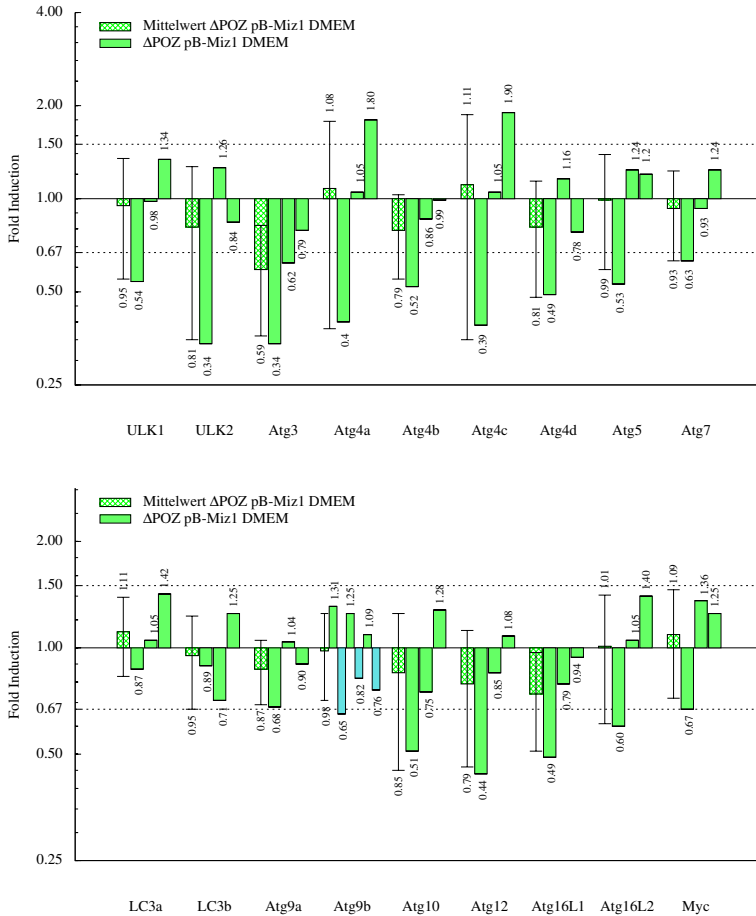
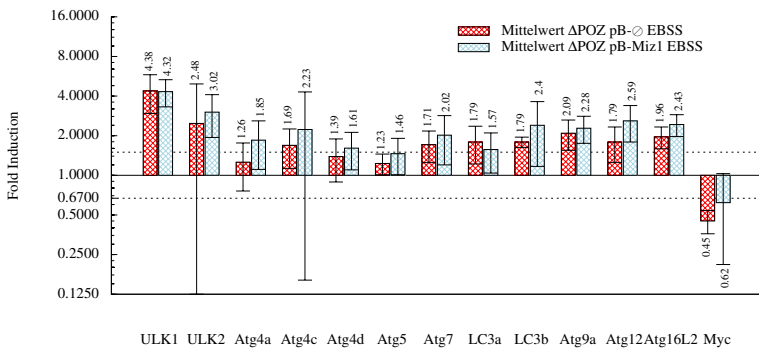


Abbildung 3.22: Abhängigkeit der Genexpression von der POZ-Domäne von hMiz1 in mit pB-Miz1 oder pB-Miz1 infizierten ΔPOZ 3T3 MEFs. Die Genexpressionen der mit pB-Miz1 infizierten und mit DMEM inkubierten ΔPOZ Zellen sind auf die Expression der mit pB-Miz1 infizierten und DMEM inkubierten ΔPOZ Zellen normiert und als n-fache Expression dieser abgebildet. Es sind jeweils die Werte der drei biologisch unabhängigen Messungen dargestellt (grün) sowie der daraus berechnete Mittelwert mit Standardabweichung (grün schraffiert). Für Atg9b sind außerdem die Werte der technischen Replikate abgebildet, die in die Berechnung des Mittelwerts für Atg9b eingehen (türkis). Die Genexpression von Atg3 wird nach den verwendeten Einteilungskriterien durch Substitution von humanem Miz1 reprimiert.

3.2.2.2.2 Regulation der Genexpression durch EBSS und Einfluss von hMiz1 Um zu prüfen, ob die Expressionen der ausgewählten Gene in den infizierten Δ POZ Zellen durch EBSS reguliert werden, wurden die Genexpressionen in mit DMEM inkubierten Zellen denen der mit EBSS inkubierten Vergleichszellen gegenübergestellt. Es wurden die gleichen Grenzen wie für die Auswertung der Genexpressionen in 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} ohne retrovirale Infektion angewendet (Kapitel 2.2.3.2 auf Seite 33). Für keines der untersuchten Gene konnte eine von der Stimulation durch EBSS unabhängige Expression festgestellt werden. Die Genexpression nach Inkubation mit EBSS wich entweder in mit pB- \emptyset oder in mit pB-Miz1 infizierten Zellen oder in beiden mehr als innerhalb des festgelegten Grenzbereichs von der Expression der mit DMEM inkubierten Vergleichszellen ab. Alle untersuchten Gene zeigten eine durch EBSS regulierte Genexpression.



Differenz zwischen normierten PCR-Zykluszahlen
 $a = \Delta\Delta Ct \Delta POZ pB-\emptyset EBSS - \Delta\Delta Ct \Delta POZ pB-Miz1 EBSS$

ULK1	ULK2	Atg4a	Atg4c	Atg4d	Atg5	Atg7	LC3a	LC3b	Atg9a	Atg12	Atg16L2	Myc
0.05	0.43	0.44	0.28	0.23	0.35	0.35	0.22	0.34	0.13	0.57	0.38	0.26

Abbildung 3.23: Miz1-unabhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in mit pB- \emptyset und pB-Miz1 infizierten 3T3 MEFs (*Inf3T3* 2-3). Die Genexpressionen der mit pB- \emptyset infizierten und mit EBSS inkubierten Δ POZ Zellen (rot schraffiert) sind auf die Expression derselben Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als n-fache Expression dieser dargestellt. Analog sind die Genexpressionen der mit pB-Miz1 infizierten und mit EBSS inkubierten Δ POZ Zellen (blau schraffiert) auf die Expression der mit pB-Miz1 infizierten Δ POZ Zellen unter DMEM-Bedingungen bezogen und als n-fache Expression dieser abgebildet. Es sind die aus den Messungen 1-3 berechneten Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Die in der Tabelle abgebildeten Differenzen sind kleiner 0,585.

Als nächstes wurde untersucht, ob die durch EBSS regulierten Gene Miz1-abhängig oder -unabhängig durch EBSS reguliert werden. Hierfür wurde die Genexpression der mit pB- \emptyset infizierten und mit EBSS inkubierten Zellen auf die Expression derselben Zellen unter Vollmedium-Bedingungen normiert. Analog wurde die Expression der gehungerten mit pB-Miz1 infizierten Zellen auf die Expression der mit Vollmedium inkubierten und mit pB-Miz1 infizierten Zellen bezogen. In die Auswertung gehen die Werte der Messung 1-3 ein. In Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24 auf Seite 81 sind die aus diesen Werten berechneten Mittelwerte dargestellt. Eine Miz1-unabhängige

3 Ergebnisse

Regulation zeigten die Gene ULK1, ULK2, Atg4a, Atg4c, Atg4d, Atg5, Atg7, LC3a, LC3b, Atg9a, Atg12, Atg16L2 und Myc (Abbildung 3.23 auf Seite 80, Gruppe *Inf3T3* 2-3). Die Gene zeigten eine durch EBSS regulierte Genexpression, die keine Abhängigkeit von der POZ-Domäne von Miz1 aufwies. Bis auf die Expression des Gens Myc stieg die Genexpression nach Inkubation mit EBSS sowohl in mit pB- \emptyset als auch mit pB-Miz1 infizierten Zellen an. Die Höhe der durch die Inkubation mit EBSS ausgelösten Expressionsänderung betrug jedoch zwischen Zellen, die das humane Miz1 und damit die POZ-Domäne enthielten (pB-Miz1), und Zellen, die lediglich das trunkierte, murine Miz1 aufwiesen (pB- \emptyset), weniger als 0,585 in den $\Delta\Delta\text{Ct}$ Werten und überstieg damit nicht den Grenzwert. Die Expression von Myc sank in mit EBSS inkubierten Zellen, der Expressionsabfall war in mit pB-Miz1 und mit pB- \emptyset infizierten Zellen vergleichbar

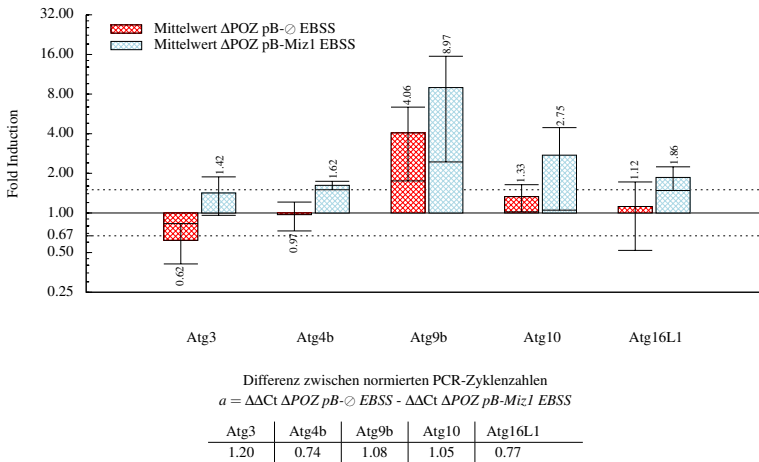


Abbildung 3.24: Miz1-abhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in mit pB- \emptyset und pB-Miz1 infizierten 3T3 MEFs (*Inf3T3* 2-5). Die Genexpressionen der mit pB- \emptyset infizierten und mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (rot schraffiert) sind auf die Expression derselben Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als n-fache Expression dieser dargestellt. Analog sind die Genexpressionen der mit pB-Miz1 infizierten und mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (blau schraffiert) auf die Expression der mit pB-Miz1 infizierten ΔPOZ Zellen unter DMEM-Bedingungen bezogen und als n-fache Expression dieser abgebildet. Es sind die aus den Messungen 1-3 berechneten Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Für Atg9b gehen in die Berechnung des Mittelwertes außerdem die Werte der technischen Replikate der Messung 1 und 2 ein. Die in der Tabelle abgebildeten Differenzen sind grösser 0,585.

Eine von der POZ-Domäne abhängige Regulation zeigten die Gene Atg3, Atg4b, Atg9b, Atg10 und Atg16L1 (Abbildung 3.24, Gruppe *Inf3T3* 2-5). Bei Atg3 und Atg4b war in den Zellen, die das humane Miz1 und damit die POZ-Domäne enthielten, im Gegensatz zu den mit dem Leervektor infizierten Zellen ein Anstieg der Genexpression nach der Stimulation durch EBSS zu verzeichnen. Die Genexpressionen der Gene Atg9b, Atg10 und Atg16L1 wurden in Zellen, die das hMiz1 enthielten, stärker durch EBSS induziert als in Zellen, die das trunkierte Miz1 enthielten (pB- \emptyset).

Die Substitution des humanen Miz1 bewirkte somit eine stärkere Zunahme der Genexpression nach Inkubation mit EBSS als die EBSS-Stimulation der mit dem Leervektor infizierten Δ POZ Zellen

3.2.2.3 Genexpressionsanalyse in mit pB- \emptyset und pB-Miz1 infizierten Δ POZ MEFs^{ARF}

3.2.2.3.1 Einfluss von hMiz1 auf die Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene Die mit pB- \emptyset und pB-Miz1 infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} wurden auf Genexpressionsveränderungen untersucht, die auf das Einbringen des nicht trunkierten, humanen Miz1 zurückzuführen sind. Hierfür wurden die Genexpressionen der mit dem Leervektor infizierten Zellen mit den Genexpressionen der mit pB-Miz1 infizierten Zellen jeweils unter DMEM-Bedingungen verglichen. Die Ergebnisse beruhen auf den Werten einer einzigen durchgeführten Messung. Die für die Einteilung der Gene verwendeten Grenzwerte entsprechen denen, die für nicht-infizierte 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} zugrunde gelegt wurden (Kapitel 2.2.3.2 auf Seite 33).

Abbildung 3.25 zeigt die Gene ULK1, ULK2, Atg4b, Atg4c, Atg4d, LC3a, Atg9a, Atg12, Atg16L1, Atg16L2 und Myc, die eine von der POZ-Domäne von Miz1 unabhängige Genexpression in infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} aufwiesen (Gruppe *InfARF* 1-1). Die Expression in mit humanem Miz1 infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} wich nicht mehr als innerhalb der festgelegten Grenzen von der in mit pB- \emptyset infizierten Zellen gemessenen Genexpression ab.

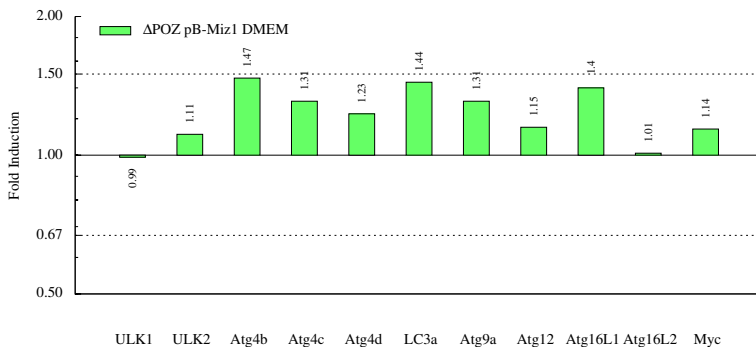


Abbildung 3.25: Von der POZ-Domäne unabhängige Genexpression in mit pB- \emptyset oder pB-Miz1 infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} (*InfARF* 1-1). Die Genexpressionen der mit pB-Miz1 infizierten und mit DMEM inkubierten Δ POZ Zellen sind auf die Expression der mit pB- \emptyset infizierten und DMEM inkubierten Δ POZ Zellen normiert und als n-fache Expression dieser abgebildet. Es sind die Werte einer Messung dargestellt. Die Genexpressionen in mit pB-Miz1 infizierten Δ POZ Zellen wichen nicht mehr als innerhalb der festgelegten Grenzen von der Expression der mit dem Leervektor infizierten Δ POZ Zellen ab. Die Substitution von humanem Miz1 bewirkte in Δ POZ Zellen keine nach den gewählten Einteilungskriterien signifikante Änderung der Genexpression.

Einen Anstieg der Genexpression auf mehr als das 1,5fache bewirkte die Substitution von hMiz bei den Genen Atg3, Atg4a, Atg5, Atg7, LC3b, Atg9b und Atg10 (Abbildung 3.26 auf Seite 83). Diese Gene zeigten eine von der POZ-Domäne von Miz1 abhängige Genexpression (Gruppe *Inf*

3 Ergebnisse

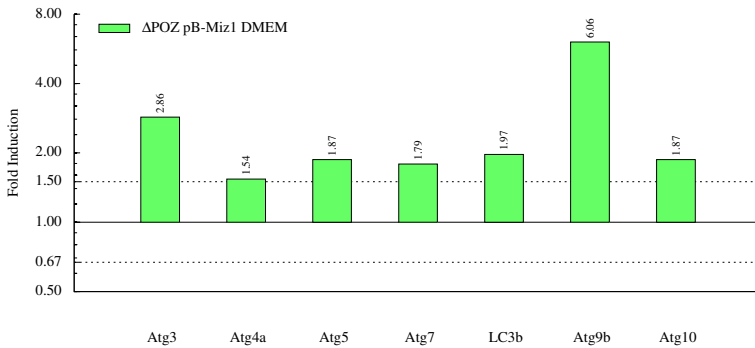


Abbildung 3.26: Von der POZ-Domäne abhängige Genexpression in mit pB- \emptyset oder pB-Miz1 infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} (*InfARF* 1-3). Die Genexpressionen der mit pB-Miz1 infizierten und mit DMEM inkubierten Δ POZ Zellen sind auf die Expression der mit pB- \emptyset infizierten und DMEM inkubierten Δ POZ Zellen normiert und als n-fache Expression dieser abgebildet. Es sind die Werte einer einzelnen Messung dargestellt. Die Expression der dargestellten Gene war in mit pB-Miz1 infizierten Zellen unter Berücksichtigung der gewählten Einteilungskriterien signifikant erhöht im Vergleich zur Genexpression in mit pB- \emptyset infizierten Zellen. Das Einbringen der POZ-Domäne durch die Substitution von humanem Miz1 bewirkte in Δ POZ MEFs^{ARF} einen Anstieg der Genexpression.

fARF 1-3). Die Genexpressionen in mit pB-Miz1 infizierten Zellen war im Vergleich zu den mit dem Leervektor infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} unter Berücksichtigung der gewählten Einteilungskriterien signifikant erhöht.

3.2.2.3.2 Regulation der Genexpression durch EBSS und Einfluss von hMiz1 Es wurde untersucht, ob die Inkubation mit EBSS einen Einfluss auf die Genexpression der ausgewählten Gene in den mit pB- \emptyset und pB-Miz1 infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} nimmt. Die Genexpressionen der mit pB- \emptyset infizierten und mit EBSS inkubierten Zellen wurden auf die Expression derselben Zellen unter Vollmedium-Bedingungen normiert. Analog wurde die Expression der gehungerten mit pB-Miz1 infizierten Zellen auf die Expression der mit Vollmedium inkubierten und mit pB-Miz1 infizierten Zellen bezogen. Die Einteilung der Gene erfolgte anhand der gleichen Kriterien, die für nicht-infizierte 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} verwendet wurden (Kapitel 2.2.3.2 auf Seite 33).

Die Auswertungen beruhen auf den Daten einer Messung. Für jedes der untersuchten Gene konnte in den infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} eine Regulation der Genexpression durch EBSS festgestellt werden. Die Inkubation mit EBSS bewirkte in mit pB- \emptyset oder in mit pB-Miz1 infizierten Zellen oder in beiden eine 1,5fache Induktion der Genexpression im Vergleich zu mit DMEM inkubierten Zellen. Eine Ausnahme stellt die Expression von Myc dar, die durch die Inkubation mit EBSS reprimiert wurde.

3 Ergebnisse

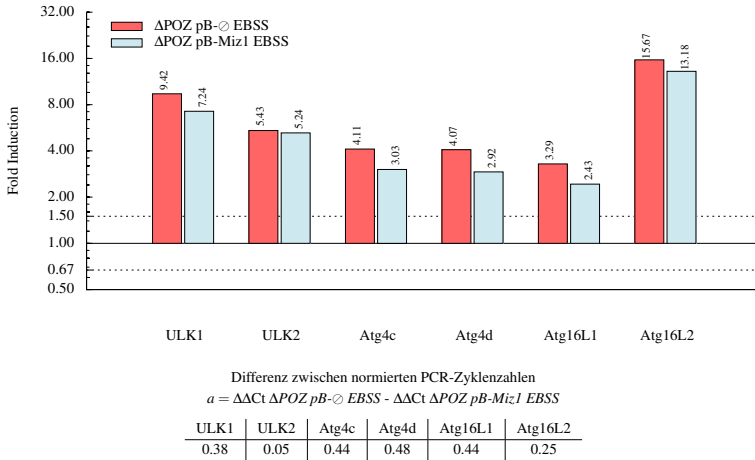


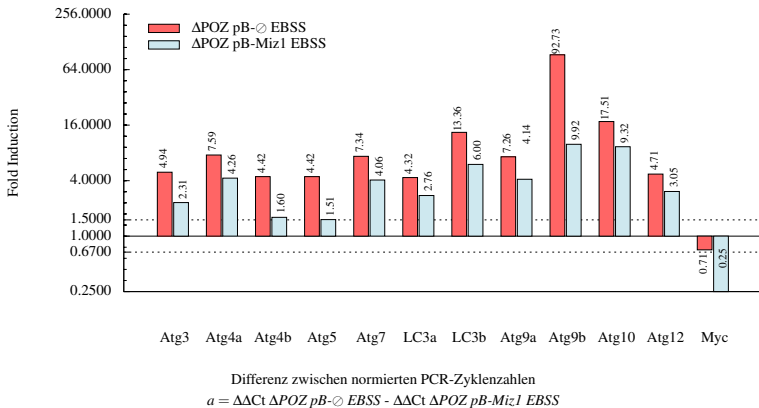
Abbildung 3.27: Miz1-unabhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in mit pB-ϕ und pB-Miz1 infizierten MEFs^{ARF} (InfARF 2-3). Die Genexpressionen der mit pB-ϕ infizierten und mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (rot) sind auf die Expression derselben Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als n-fache Expression dieser dargestellt. Analog sind die Genexpressionen der mit pB-Miz1 infizierten und mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (hellblau) auf die Expression der mit pB-Miz1 infizierten ΔPOZ Zellen unter DMEM-Bedingungen bezogen und als n-fache Expression dieser abgebildet. Es sind die Werte einer einzelnen Messung dargestellt. Die abgebildeten Gene zeigten eine durch EBSS regulierte Genexpression, die keine Abhängigkeit von der POZ-Domäne von Miz1 zeigte. Die Genexpression stieg nach Inkubation mit EBSS sowohl in mit pB-ϕ als auch mit pB-Miz1 infizierten Zellen an, der Unterschied des Expressionsanstiegs war jedoch gering. Die in der Tabelle abgebildeten Differenzen sind kleiner als 0,585.

Die Gene, deren Expressionen anhand der dargestellten Kriterien als durch EBSS reguliert eingestuft wurden, wurden weiter aufgeteilt, je nachdem ob ihre Genexpression Miz1-abhängig oder -unabhängig durch EBSS reguliert wurde.

Eine durch die Inkubation mit EBSS induzierte Genexpression, die von der POZ-Domäne von Miz1 unabhängig war, zeigten die Gene ULK1, ULK2, Atg4c, Atg4d, Atg16L1 und Atg16L2 (Abbildung 3.27, Gruppe InfARF 2-3). Der Genexpressionsanstieg durch die Inkubation mit EBSS war in mit pB-Miz1 infizierten und mit pB-ϕ infizierten Zellen vergleichbar.

Abbildung 3.28 auf Seite 85 zeigt die Gene Atg3, Atg4a, Atg4b, Atg5, Atg7, LC3a, LC3b, Atg9a, Atg9b, Atg10, Atg12 und Myc, welche eine Miz1-abhängige Induktion der Genexpression aufwiesen (Gruppe InfARF 2-5). Die Inkubation mit EBSS bewirkte eine Induktion der Genexpression, die jedoch in mit pB-Miz1 infizierten Zellen schwächer ausfiel als in mit pB-ϕ infizierten Zellen. Das heißt, die Genexpression wurde in Zellen, die lediglich das trunkierte, murine Miz1 enthielten, stärker durch EBSS induziert als in Zellen, in die die POZ-Domäne eingebracht wurde. Die Expression von Myc wurde als einzige durch die Inkubation mit EBSS reprimiert. Dabei führte das Vorhandensein der POZ-Domäne in mit pB-Miz1 infizierten Zellen zu einer stärkeren Repression der Genexpression als in Zellen, die das trunkierte, murine Miz1 aufwiesen.

3 Ergebnisse



Atg3	Atg4a	Atg4b	Atg5	Atg7	LC3a	LC3b	Atg9a	Atg9b	Atg10	Atg12	Myc
1.10	1.10	1.47	1.55	0.85	0.64	1.16	0.81	3.22	0.91	0.62	1.52

Abbildung 3.28: Miz1-abhängige Regulation der Genexpression durch EBSS in mit pB-⊖ und pB-Miz1 infizierten MEFs^{ARF} (*InfARF* 2-5). Die Genexpressionen der mit pB-⊖ infizierten und mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (rot) sind auf die Expression derselben Zellen unter DMEM-Bedingungen normiert und als n-fache Expression dieser dargestellt. Analog sind die Genexpressionen der mit pB-Miz1 infizierten und mit EBSS inkubierten ΔPOZ Zellen (hellblau) auf die Expression der mit pB-Miz1 infizierten ΔPOZ Zellen unter DMEM-Bedingungen bezogen und als n-fache Expression dieser abgebildet. Es sind die Werte einer einzelnen Messung dargestellt. Die Genexpressionen der dargestellten Gene wurden in Zellen, die das trunkierte Miz1 enthielten (pB-⊖), stärker durch EBSS induziert als in Zellen, die das hMiz1 enthielten (pB-Miz1). Die Expression von Myc wurde in Zellen, die die POZ-Domäne enthielten (pB-Miz1), stärker durch EBSS reprimiert als in Zellen, die das trunkierte Miz1 aufwiesen. Die in der Tabelle abgebildeten Differenzen sind grösser 0,585.

3.2.3 Einfluss der retroviralen hMiz1-Substitution auf die Morphologie

Veränderungen, die im Rahmen der Autophagie in der Zelle entstehen, sollten auch auf morphologischer Ebene untersucht werden. Hierfür wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit pB-⊖ und pB-Miz1 infizierten ΔPOZ-Knockout Zellen angefertigt und vergleichend ausgewertet. Die Zellen wurden dahingehend untersucht, ob das Vorhandensein der POZ-Domäne von Miz1 einen Einfluss auf die Morphologie der Zellen hat und ob die Anzahl oder Struktur der autophagischen Vakuolen dadurch beeinflusst wird. Analog zu den vorherigen Kapiteln wurden die Zellen auch in diesem Experiment in einem Stimulationsversuch durch AS-Entzug zur Autophagie angeregt. Es wurde untersucht, ob die Induktion der Autophagie morphologisch fassbare Veränderungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen hervorruft und wie sich diese Veränderungen zwischen Zellen, die das vollständige Miz1-Gen enthalten und solchen, denen die POZ-Domäne von Miz1 fehlt, unterscheiden. Im Speziellen interessierten hierbei Veränderungen, die sich im lysosomal-autophagischen Kompartiment abspielen.

3 Ergebnisse

Es wurden mit pB-○ oder pB-Miz1 infizierte Δ POZ 3T3 MEFs aus dem 2. und 3. Experiment der viralen Infektion ausgewertet. Die Aufbereitung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.2.2 auf Seite 29 beschrieben.

Autophagie ist ein dynamischer Prozess aus Autophagosomenbildung, Fusion der Autophagosomen mit primären Lysosomen und lysosomalem Abbau des sequestrierten Materials. Der stetige Fluss durch das autophagisch-lysosomale Kompartiment wird auch als „autophagischer Flux“ bezeichnet. Während basaler Autophagie kommt es zu einem Gleichgewicht aus Neubildung von Autophagosomen und der Umwandlung dieser in Autolysosomen. Der Begriff autophagische Vakuole dient dabei als Überbegriff für Autophagosomen und Autolysosomen. Die Heterogenität von Autolysosomen kommt dadurch zustande, dass sich die autophagischen Vakuolen in verschiedenen Reifestadien befinden. Die Morphologie, der in einer Zelle vorkommenden autophagischen Vakuolen kann daher stark variieren, wobei die Unterschiede sowohl die Begrenzung (Autophagosom: Doppelmembran; Autolysosom: Einfachmembran) als auch den Inhalt der autophagischen Vakuolen betreffen. Neben von einer Doppelmembran umschlossenen Vesikeln mit unverdaulichem, zytoplasmatischem Inhalt, die zum Teil auch intrazelluläre Organellen wie Mitochondrien oder Teile von ER einschließen, gibt es Vakuolen, die von einer einzelnen Membran umschlossen sind und zytoplasmatisches Material in unterschiedlichen Stadien des Abbaus enthalten [Mizushima et al., 2010].

Bei der Auswertung der beiden durchgeführten Experimente konnten drei grundsätzliche Typen autophagischer Vakuolen identifiziert werden. Um eine eindeutige Zuordnung zu erleichtern, werden die verschiedenen Typen von Vakuolen im Folgenden mit Nummern bezeichnet. Abbildung 3.29 zeigt eine schematische Zeichnung der drei Vakuolentypen.

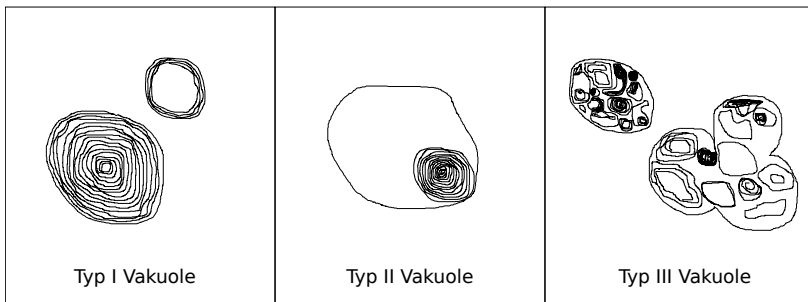


Abbildung 3.29: Schema der Vakuolentypen I-III. Schematische Zeichnung der drei Vakuolentypen, die in den Zellen der beiden durchgeführten Experimente identifiziert werden konnten.

Bei Typ I Vakuolen handelt es sich um Vesikel unterschiedlicher Größe, die durch einen elektrodichten Rand gekennzeichnet sind. Dieser kommt durch mehrere Lagen von Membranen zustande, die sich lamellenförmig aneinanderlagern. Die Vakuolen weisen einen unterschiedlich starken Grad der Lamellenbildung auf. Dabei reicht die Spanne von vollständig mit Lamellen ausgefüllten Vakuolen bis zu Vakuolen, die lediglich von einigen Lagen Membranen begrenzt sind. Zum Teil ist die Begrenzung einer Vakuole nicht homogen. Während Vakuolen an einem Pol von mehreren

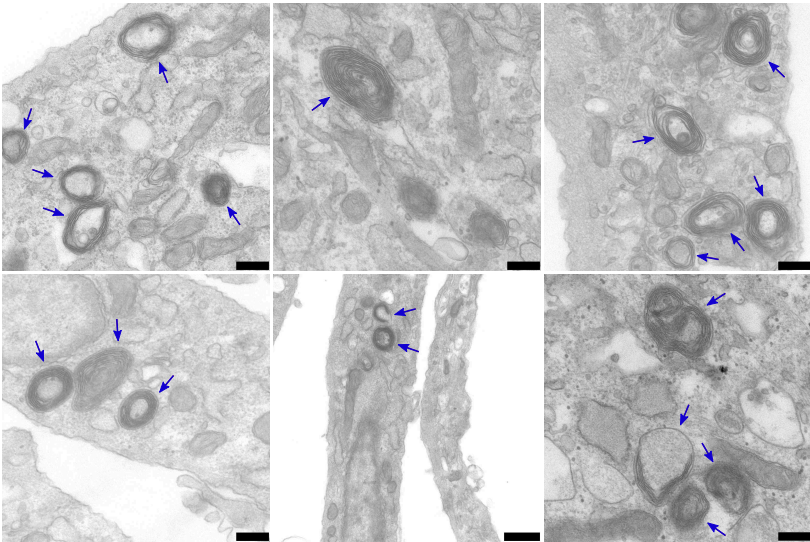


Abbildung 3.30: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Typ I Vakuolen. Typ I Vakuolen sind mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet. Die charakteristische Lamellensuktur der Typ I Vakuolen ist gut zu erkennen. Es handelt sich um mit einem pBABE-Vektor transfizierte Δ POZ Zellen, die mit DMEM oder EBSS inkubiert wurden. Auswertung von zwei Experimenten. Messbalken: 250 nm

Membranlagen umschlossen werden, weisen sie am anderen Pol lediglich eine Membran als Begrenzung auf. Zudem gibt es Vakuolen, deren Membranen wirbelartig in das Innere der Vakuolen reichen und das Lumen kompartimentieren. Wenn ein Lumen in den Vakuolen vorhanden ist, ist der Inhalt zum Teil weniger elektronendicht als das umgebende Zytoplasma, manchmal sieht es jedoch auch identisch aus. Selten können größere membranartige Strukturen im Lumen erkannt werden. Abbildung 3.30 zeigt Beispiele elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Typ I Vakuolen aus den untersuchten Zellen.

Typ II Vakuolen sind durch eine einfache Membran begrenzt und weisen charakteristischerweise ein auffällig großes und helles Lumen auf. Die Lumina können beträchtliche Ausmaße annehmen. Der Inhalt der Vakuolen besteht hauptsächlich aus Material geringer Elektronendichte, zum Teil sieht es aus wie das umgebende Zytoplasma. Am Rand der Vakuolen sind häufig kleine Ansammlungen von elektronendichtem Material zu finden. Manchmal enthalten die Vakuolen kleine, von Lamellen umgebene Vesikel. Größere Strukturen wie sequestrierte Organellen sind nicht zu finden. Beispiele für Typ II Vakuolen sind Abbildung 3.31 auf Seite 88 zu entnehmen.

Ein weiterer Typ von Vakuolen wird im Folgenden als Typ III Vakuole bezeichnet. Es handelt sich um sehr heterogene, meist große Vakuolen mit polymorphem Inhalt. Im Lumen ist häufig kein Zytoplasma mehr nachzuweisen, dafür ist es von einer Vielzahl elektronendichten Materials ausgefüllt. Bei diesem handelt es sich um membranhaltige Strukturen und unverdautes zytoplasmatisches Material. Häufig kommen die Vakuolen nicht isoliert vor, sondern es konfluieren mehrere Vakuolen

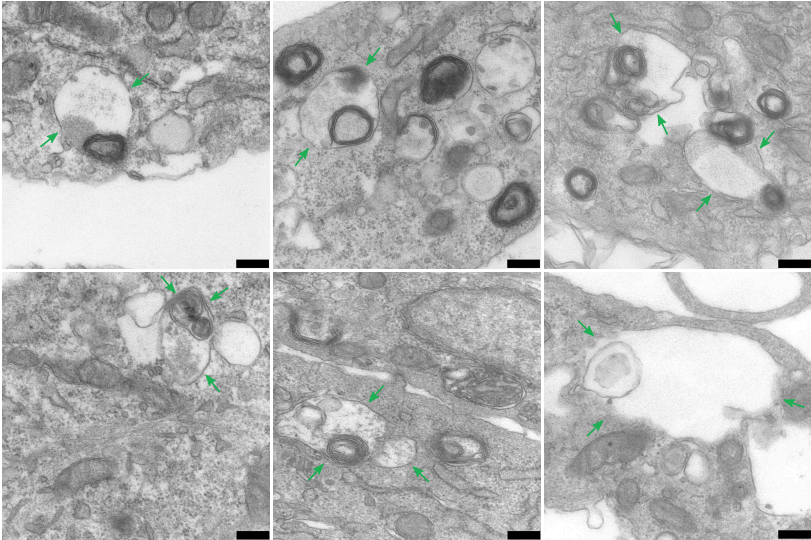


Abbildung 3.31: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Typ II Vakuolen. Typ II Vakuolen sind mit einem grünen Pfeil markiert. In Δ POZ Zellen, die mit hMiz1 substituiert wurden, konnten nach der Inkubation mit EBSS teilweise Typ II Vakuolen mit sehr großem Lumen gefunden werden (z.B. Bild unten rechts). Es handelt sich um mit einem pBABE-Vektor transfizierte Δ POZ Zellen, die mit DMEM oder EBSS inkubiert wurden. Auswertung von zwei Experimenten. Messbalken: 250 nm

zu einer größeren polymorphen Struktur. In den ausgewerteten Präparaten können zum Teil riesige dieser konfluierenden autophagischen Areale nachgewiesen werden. Abbildung 3.32 auf Seite 89 zeigt Abbildungen von Typ III Vakuolen.

Abbildung 3.33 auf Seite 90 zeigt eine schematische Übersicht über die Vakuolen, die in den Zellen der beiden ausgewerteten Experimente gefunden wurden. Sie gibt einen Überblick über die Verteilung der jeweiligen Vakuolentypen zwischen Zellen mit bzw. ohne Miz1, jeweils inkubiert mit DMEM oder EBSS. In Abbildung 3.34 auf Seite 91 ist die Verteilung der Vakuolentypen anhand elektronenmikroskopischer Übersichtsaufnahmen zu sehen. Da die Ergebnisse der beiden durchgeführten Experimente nahezu gleich waren, werden sie zusammenfassend dargestellt; wenn es Unterschiede gibt, wird dies beschrieben.

In den mit dem Leervektor infizierten Δ POZ Zellen überwogen unter DMEM-Bedingungen Typ I Vakuolen. In zahlreichen Zellen waren zudem Typ III Vakuolen nachzuweisen. Dies ist sehr auffällig, da Typ III Vakuolen ausschließlich in Zellen ohne Miz1 unter DMEM-Bedingungen zu finden waren. Sie deuten auf einen verlangsamten Abbau des sequestrierten Materials hin. Während in Zellen des zweiten Experiments diese beiden Typen die einzigen vorkommenden Vakuolentypen waren, existierten in Zellen des ersten Experiments darüberhinaus auch Typ II Vakuolen.

Wurden die mit dem Leervektor infizierten Δ POZ Zellen durch EBSS stimuliert, änderte sich die Morphologie der beobachteten Vakuolentypen. Neben Typ I Vakuolen, die auch nach der Be-

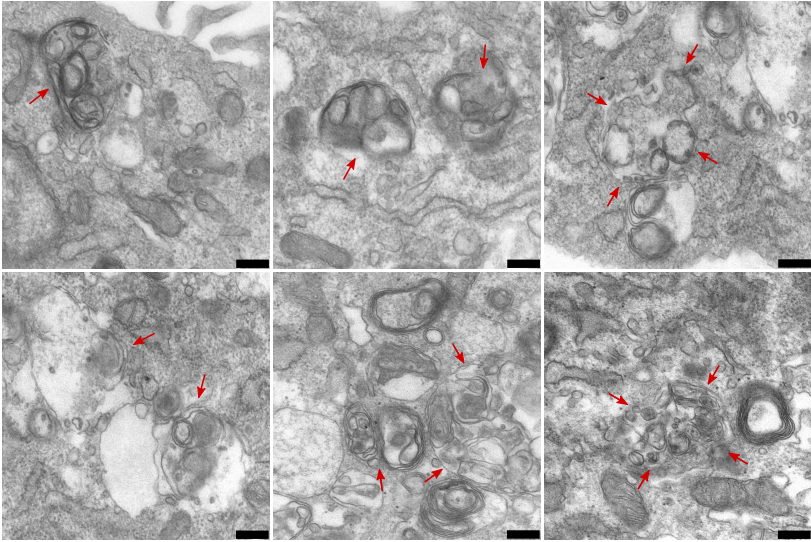


Abbildung 3.32: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Typ III Vakuolen. Die sehr heterogenen Typ III Vakuolen (gekennzeichnet durch einen roten Pfeil) konfluieren häufig zu großen autophagischen Arealen. Es handelt sich um mit pBABE- Δ transfizierte Δ POZ Zellen, die mit DMEM inkubiert wurden. Auswertung von zwei Experimenten. Messbalken: 250 nm

handlung mit EBSS noch nachgewiesen werden konnten, kamen hier zahlreiche Typ II Vakuolen hinzu. Diese Vakuolen waren kleiner als die Typ III Vakuolen der oben beschriebenen mit DMEM inkubierten Zellen und wiesen deutlich weniger unverdauten zytoplasmatischen Inhalt auf. Typ III Vakuolen konnten in diesen Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die Zellen auf die Stimulation durch EBSS reagierten und es legt die Vermutung nahe, dass der Abbau des sequestrierten Materials durch die Stimulation durch EBSS verbessert wird. Ein weiterer Hinweis, dass die Zellen auf die Stimulation durch EBSS reagierten, war, dass sich die Anzahl der autophagischen Vakuolen insgesamt erhöhte. Dies konnte während des Mikroskopierens festgestellt werden, allerdings ist dies auf den Übersichtsbildern der Abbildung 3.34 auf Seite 91 nicht ganz eindeutig zu erkennen.

Wenn man Zellen unter DMEM-Bedingungen vergleicht, die mit dem Leervektor infiziert oder mit pB-Miz1 infiziert wurden, können deutliche Unterschiede im lysosomal-autophagischen Kompartiment festgestellt werden. Die Δ POZ Zellen, die mit humanem Miz1 substituiert wurden, zeigten unter DMEM-Bedingungen zahlreiche Typ I sowie vereinzelt Typ II Vakuolen, während Typ III Vakuolen nicht nachweisbar waren. Die Substitution von Miz1 in Δ POZ Zellen führte somit dazu, dass das Stadium der Typ III Vakuolen nicht mehr angetroffen wurde. Es wäre denkbar, dass die Substitution von Miz1 eine Verkürzung des Stadiums bewirkte, in der Typ III Vakuolen vorhanden waren, und das Gleichgewicht in Richtung der Typ II Vakuolen verschob. Es kann vermutet wer-

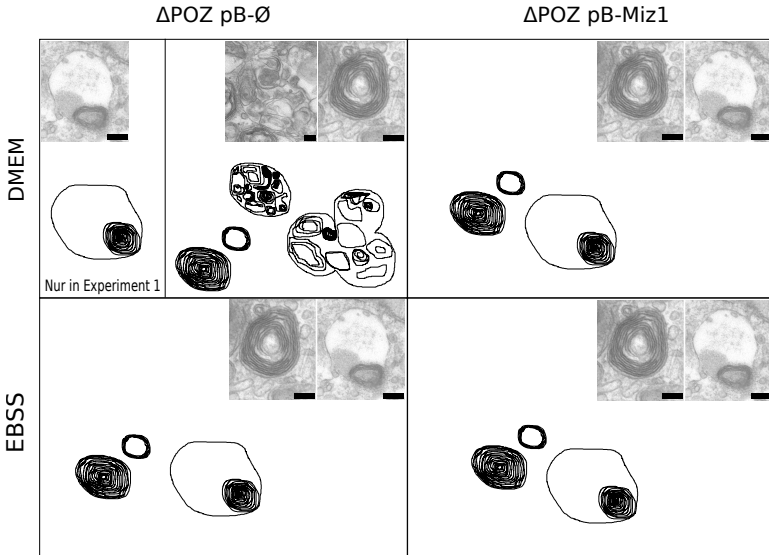


Abbildung 3.33: Schematische Übersicht über die Verteilung der Vakuolentypen in den untersuchten Zellen. Die Δ POZ Zellen wurden entweder mit pB-Ø oder pB-Miz1 infiziert und für 6 Std. mit DMEM oder EBSS inkubiert. Es wurden zwei Experimente ausgewertet. Die mit dem Leervektor (pB-Ø) infizierten und mit DMEM inkubierten Zellen wiesen Typ I und Typ III Vakuolen auf. Im ersten Experiment konnten in diesen Zellen zusätzlich Typ II Vakuolen identifiziert werden. Nach der Inkubation mit EBSS waren in den mit dem Leervektor infizierten Zellen keine Typ III Vakuolen mehr nachzuweisen. Sie wiesen Typ I und II Vakuolen auf. Auch nach der Substitution von humanem Miz1 waren in den Δ POZ Zellen keine Typ III Vakuolen zu finden. Dies war unabhängig vom Medium: sowohl die mit DMEM als auch die mit EBSS inkubierten Zellen bildeten Typ I und II Vakuolen aus. In der oberen rechten Ecke eines jeden Rechtecks sind typische Beispiele elektronenmikroskopischer Aufnahmen der vorkommenden Vakuolentypen abgebildet. Messbalken: 125 nm

den, dass mit der Substitution der POZ-Domäne von Miz1 die Fähigkeit zur schnelleren Reifung autophagischer Vakuolen wiederhergestellt wurde.

Die Inkubation mit EBSS änderte die Struktur der autophagischen Vesikel der mit pB-Miz1 infizierten Zellen nicht wesentlich. Die stimulierten Zellen wiesen ebenfalls Typ I und Typ II sowie keine Typ III Vakuolen auf. Der Unterschied bestand in der Anzahl der ausgebildeten Vakuolen. Anhand der gesteigerten Anzahl autophagischer Vakuolen kann auf eine Induktion der Autophagie geschlossen werden. Ein weiterer charakteristischer Unterschied zwischen dem stimulierten und dem unstimulierten Zustand war die Größe des Lumens der Typ II Vakuolen. Während das Lumen in Typ II Vakuolen grundsätzlich nicht klein ist, war es in einigen der stimulierten Zellen deutlich größer als in unstimulierten Zellen. In Relation zum Zytoplasma wies es in den durch EBSS stimulierten Zellen zum Teil beträchtliche Ausmaße auf. Ein extremes Beispiel einer mit pB-Miz1 infizierten und mit EBSS stimulierten Δ POZ-Zelle, die sehr große Typ II Vakuolen ausbildete, zeigt Abbildung 3.35 auf Seite 92.

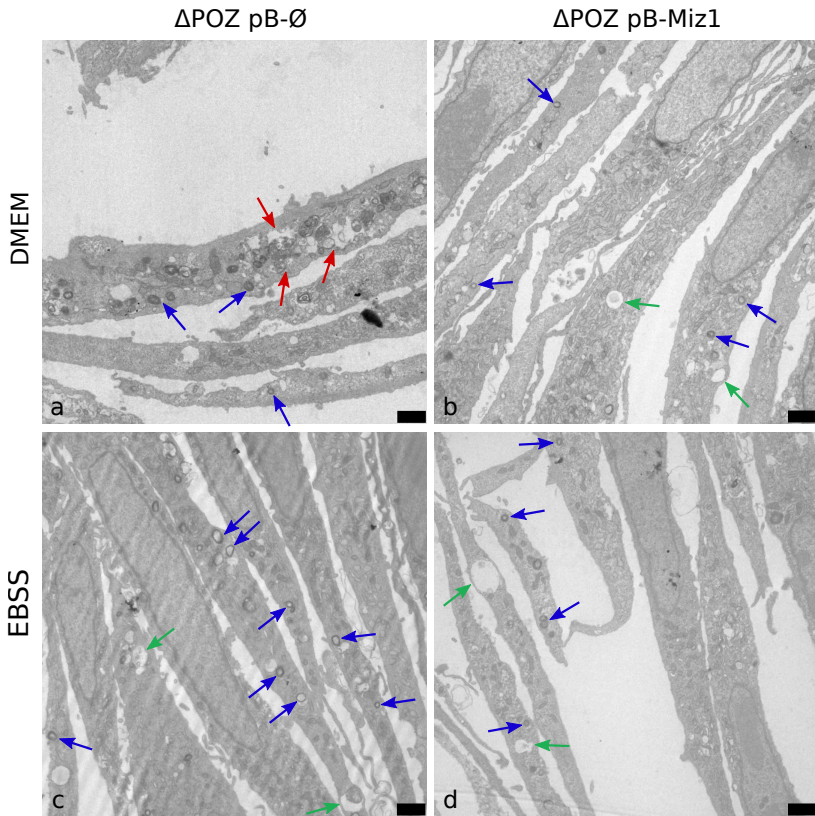


Abbildung 3.34: Elektronenmikroskopische Übersichtsbilder der untersuchten Zellen. Die Δ POZ Zellen wurden entweder mit pB-Ø oder pB-Miz1 infiziert und für 6 Std. mit DMEM oder EBSS inkubiert. Es wurden zwei Experimente ausgewertet. In a) sind autophagische Areale der mit DMEM inkubierten Δ POZ Zellen ohne Miz1 zu erkennen, die den Typ III Vakuolen entsprechen. Daneben finden sich Typ I und II Vakuolen. c) zeigt diese Zellen nach der Inkubation mit EBSS. Es finden sich nur Typ I und II Vakuolen. b) zeigt eine Übersicht der mit humanem Miz1 substituierten Δ POZ Zellen unter DMEM-Bedingungen. Es überwiegen Typ I Vakuolen, Typ II Vakuolen sind aber auch zu erkennen. In d) sind die mit humanem Miz1 infizierten Zellen nach der Inkubation mit EBSS abgebildet. Neben Typ I Vakuolen können Typ II Vakuolen identifiziert werden, die z.T. sehr große Lumina aufweisen. Typ III Vakuolen kommen nicht vor. Die erhöhte Anzahl an Vakuolen in den mit EBSS stimulierten Zellen ist in dieser Abbildung nicht ganz eindeutig zu erkennen. Typ I Vakuolen: blauer Pfeil, Typ II Vakuolen: grüner Pfeil, Typ III Vakuolen: roter Pfeil. Messbalken: 1 μ m

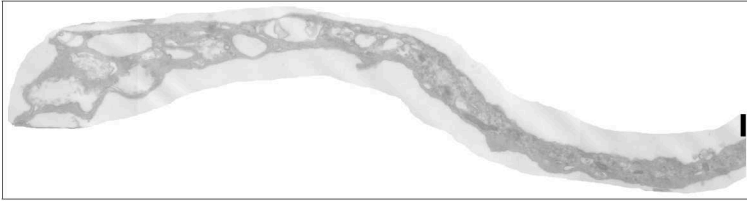


Abbildung 3.35: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit pB-Miz1 infizierten und mit EBSS inkubierten APOZ-Zelle. Sie stellt ein extremes Beispiel einer Zelle dar, die sehr große Typ II Vakuolen ausbildet. Messbalken: 500 nm

3.3 Herstellung von Sonden für einen RNase Protection Assay

Mit Hilfe eines RNase Protection Assays sollten die Genexpressionen einiger Autophagie-assoziiierter Gene genauer untersucht werden (siehe Kapitel 2.2.3.8 auf Seite 47). Es sollten äquivalente Expressionsanalysen zu den vorher beschriebenen qPCR-Messungen durchgeführt und die Ergebnisse dann mit den Resultaten der qPCR verglichen werden.

Für die SONDENSYNTHE wurden zunächst die Sequenzen der zu untersuchenden Gene amplifiziert. Dann wurden die DNA-Sequenzen durch die Transkription einer RNA-Polymerase unter Verwendung von mit Digoxigenin markierten Nucleotiden in markierte RNA-Sequenzen umgeschrieben. Die Transkription erfolgte jeweils in 3' oder in 5' Richtung, sodass sogenannte sense oder anti sense Sonden entstanden. Das genaue Vorgehen ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.3.1 Klonierung von DNA-Sequenzen Autophagie-assoziiierter Gene in den Vektor pCR®2.1

Es wurden elf Autophagie-assoziierte Gene ausgewählt, deren Genexpression untersucht werden sollte. Um die RNA dieser Gene zu detektieren, wurden Sonden hergestellt, die komplementär an die RNA binden und sie damit sichtbar machen können (Kapitel 2.2.3.8 auf Seite 47).

Für die Synthese der Sonden war es zunächst nötig, die DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Gene zu amplifizieren. Hierfür wurden elf Primerpaare ausgewählt (siehe Tabelle 2.11 auf Seite 32) und die DNA-Sequenzen in einer Polymerasekettenreaktion vervielfältigt. Die PCR wurde, wie in Kapitel 2.2.3.1 auf Seite 31 beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurden die optimale Primerkonzentration und Annealingtemperatur ausgetestet. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Bedingung ausgewählt, die am deutlichsten eine einzelne, gut sichtbare Bande der richtigen Größe hervorbrachte. Die PCR wurde dann für jedes Gen mit der jeweils optimalen Bedingung wiederholt und die PCR-Produkte mit dem Vektor pCR®2.1 ligiert. Die Ligation erfolgte, wie in Kapitel 2.2.3.3 auf Seite 37 beschrieben, über eine Hybridisierung der überstehenden Base Adenosin des PCR-Produktes mit der am Vektor überstehenden Base Thymin. Vor der Ligation wurden Proben der PCR-Produkte zur Kontrolle erneut in einer Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und die Größe der Banden bestimmt. Die Ergebnisse der Elektrophorese sind in Ab-

3 Ergebnisse

bildung 3.36 dargestellt. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte kann Tabelle 2.11 auf Seite 32 entnommen werden. Die PCR-Produkte von Atg3 und Atg7 sind nicht abgebildet, da für diese Gene bereits Maxi-Präparationen des DNA-Inserts im Vektor pCR®2.1 in der Arbeitsgruppe vorlagen und diese für diese Arbeit verwendet werden konnten.

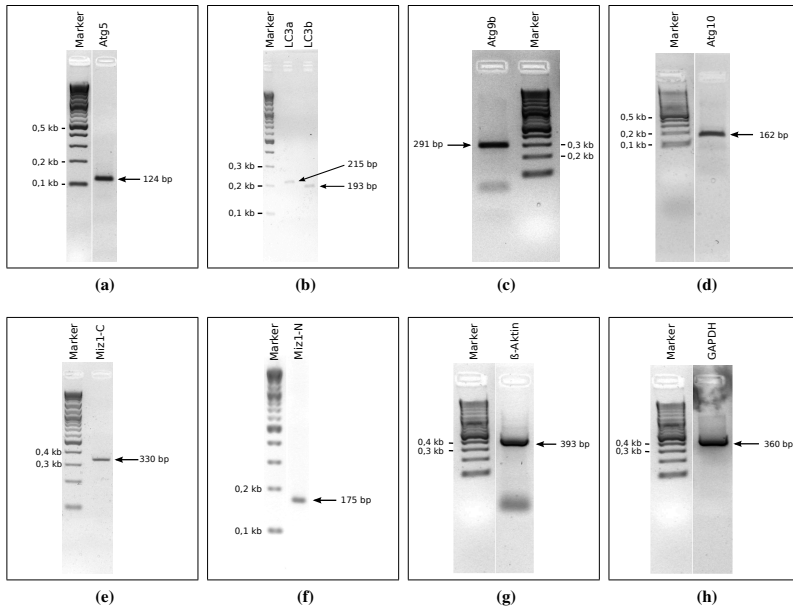


Abbildung 3.36: In den Vektor pCR®2.1 klonierte PCR-Produkte. Es wurden Proben der PCR-Produkte, die in den Vektor pCR®2.1 kloniert werden sollten, zur Kontrolle mittels Gelelektrophorese in 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. PCR-Produkte der Gene (a) Atg5, (b) LC3a und LC3b, (c) Atg9b, (d) Atg10, (e) Miz1-C, (f) Miz1-N, (g) β -Aktin und (h) GAPDH. Als DNA-Größenstandard wurde TriDye™ 2-Log verwendet.

Der mit dem PCR-Produkt ligierte Vektor wurde durch eine Transformation in *E.coli*-Bakterien eingebracht (Kapitel 2.2.3.4 auf Seite 40). Durch die Kultivierung in Ampicillin-haltigem LB-Medium erfolgte eine Selektion der Kolonien, die den Vektor aufgenommen und mit ihm eine Ampicillin-Resistenz erworben hatten. Die überlebenden und damit Plasmid-haltigen Kolonien wurden weiter durch eine Blau-Weiß-Selektionierung gefiltert. Sie ermöglichte eine Unterscheidung von Kolonien mit Plasmiden, in die eine DNA-Sequenz, im besten Fall die gewünschte DNA-Sequenz, integriert worden war, von solchen, die den ursprünglichen, ungeschnittenen Vektor aufgenommen hatten (Kapitel 2.2.3.4 auf Seite 40).

Zur Analyse der Kolonien, die ein Fragment der erwarteten Größe aufgenommen hatten, wurden die Plasmid-DNAs über eine Mini-Präparation aufgereinigt (Kapitel 2.2.3.5 auf Seite 41) und ein Verdau mit EcoRI angeschlossen (Kapitel 2.2.3.6 auf Seite 44). Der Verdau wurde anschließend

3 Ergebnisse

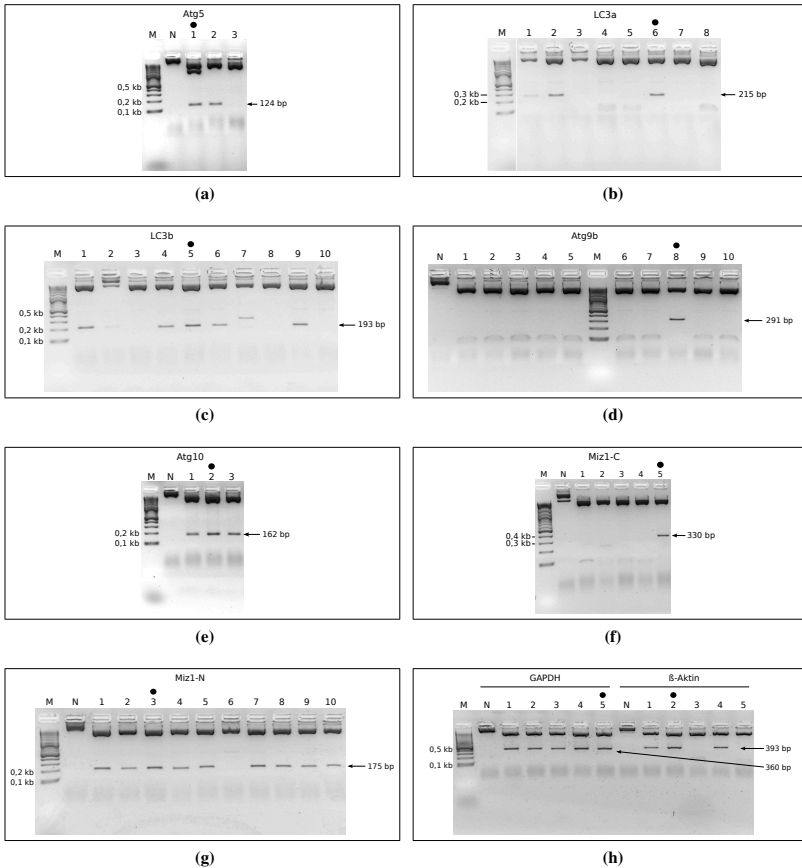


Abbildung 3.37: Verdau mit EcoRI der Mini-Präparationen des Vektors pCR[®]2.1 mit DNA-Insert. Gelelektrophorese der verdauten Mini-Präparationen in 2%igen Agarosegelen. Mini-Präparationen von (a) Atg5, (b) LC3a, (c) LC3b, (d) Atg9b, (e) Atg10, (f) Miz1-C, (g) Miz1-N, (h) GAPDH und β -Aktin. Mit einem schwarzen Punkt versehen sind die Klone, die für die Umklonierung ausgewählt wurden. Sie verfügen über ein DNA-Insert der erwarteten Größe. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte sind jeweils in die Gelelektrophorese-Bilder eingezeichnet. Ausser für LC3a und LC3b wurde für jedes Gen zusätzlich eine Nullkontrolle ohne Enzym angesetzt, gekennzeichnet durch „N“. Als DNA-Größenstandard wurde TriDye[™] 2-Log verwendet („M“).

3 Ergebnisse

in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und die Bandengröße des herausgeschnittenen Fragments mit der Länge des in den Vektor klonierten PCR-Produkts verglichen. Die Schnittstellen für *EcoRI* befinden sich im Vektor pCR®2.1 einige Basenpaare neben der Stelle, in die das PCR-Produkt integriert wurde. Folglich wurde erwartet, dass auf dem Gel eine Bande erschien, die der Größe des PCR-Produktes entsprach.

Abbildung 3.37 auf Seite 94 zeigt den Verdau der Mini-Präparationen mit *EcoRI*. Mit einem schwarzen Punkt versehen sind jeweils die Klone, die für eine Umklonierung ausgewählt wurden. Von Atg5 wiesen zwei der drei verdauten Mini-Präparationen eine Bande in der gesuchten Größe von 124 bp auf (Abb. 3.37a). Klon 1 wurde für die weitere Verwendung ausgewählt. LC3a zeigte ebenfalls drei positive Klone, wobei die Bande von Klon 1 sehr schwach war. Es wurde Klon 6 weiter verwendet (Abb. 3.37b). Bei LC3b konnten 6 Klone mit der gewünschten Bande (193 bp) nachgewiesen werden. Ein Klon wies eine Bande anderer Größe auf. Im weiteren Verlauf wurde nur noch mit Klon 5 gearbeitet (Abb. 3.37c). Bei zehn verdauten Klonen von Atg9b (Abb. 3.37d) konnte lediglich aus einem eine Bande der gewünschten Größe (291 bp) isoliert werden (Klon 8). Atg10 wies drei positive Klone auf (Bandengröße 162 bp), aus Klon 2 wurde DNA für die Umklonierung gewonnen (Abb. 3.37e). Von Miz1-C wurde der eine der fünf verdauten Klone, der eine Bande in der Größe von 330 bp aufwies, ausgewählt (Klon 5, Abb. 3.37f). In der Gelelektrophorese von Miz1-N konnten bei neun der zehn verdauten Klone eine 175 bp große Bande nachgewiesen werden. Klon 3 wurde ausgewählt (Abb. 3.37g). β -Aktin wies bei drei von fünf Klonen die erwartete Bande von 393 bp auf, GAPDH bei allen fünf der präparierten Klone (360 bp). Von β -Aktin wurde Klon 2 für die Umklonierung ausgewählt, von GAPDH Klon 5 (Abb. 3.37h).

Von den ausgewählten Klonen wurden die Plasmid-DNAs nun entweder über eine Mini-Präparation mittels des Kits von Macherey-Nagel (Kapitel 2.2.3.5 auf Seite 41) oder über eine Maxi-Präparation (Kapitel 2.2.3.5 auf Seite 43) isoliert und dann in den Bluescript Vektor umkloniert.

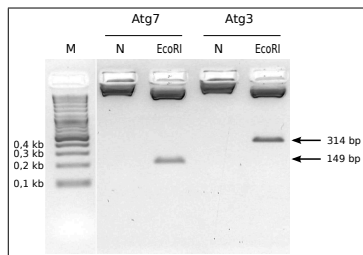


Abbildung 3.38: Verdau der Maxi-Präparationen des Vektors pCR®2.1 mit DNA-Insert mit *EcoRI* von Atg3 und Atg7. Gelelektrophorese der verdauten Maxi-Präparationen in 2%igem Agarosegel. Es wurde zusätzlich jeweils eine Nullkontrolle ohne Enzym angesetzt, gekennzeichnet durch „N“. Als DNA-Größenstandard wurde TriDye™ 2-Log verwendet („M“). Die DNA beider Proben wurde für die Umklonierung weiterverwendet.

Von Atg3 und Atg7 standen in der Arbeitsgruppe bereits Maxi-Präparationen des Vektors pCR®2.1 mit DNA-Insert zur Verfügung. Es wurden daher Verdau dieser Maxi-Präparationen mit *EcoRI* durchgeführt und nach Kontrolle der Größe der aus dem Vektor geschnittenen DNA-Fragmente,

wurde die DNA für die Umklonierung in den Bluescript Vektor weiterverwendet. Kapitel 3.38 auf Seite 95 zeigt den Verdau der Maxi-Präparationen von Atg3 und Atg7 mit EcoRI.

3.3.2 Umklonierung von pCR[®]2.1 in pBluescript

Da für die Synthese von sense und antisense Sonden ein Vektor benötigt wurde, der sowohl einen T3- als auch einen T7-Promotor aufwies, wurde die Ziel-DNA-Sequenz in den Bluescript Vektor umkloniert. Hierfür musste zunächst das DNA-Stück aus dem Vektor pCR[®]2.1 herausgeschnitten und dann mit dem vorbereiteten Bluescript Vektor ligiert werden. Um das DNA-Fragment mit dem Bluescript Vektor ligieren zu können, mussten beide die gleichen Schnittstellen aufweisen. Dies wurde erreicht, indem sowohl der Vektor als auch das DNA-Fragment in einem präparativen Verdau mit dem gleichen Enzym, nämlich EcoRI, geschnitten wurden. Der linearisierte Vektor wurde dann in einer Ligationsreaktion mit dem DNA-Stück verknüpft.

3.3.2.1 Isolieren der DNA-Fragmente aus dem Vektor pCR[®]2.1

Der Vektor pCR[®]2.1 wies zwei Schnittstellen für EcoRI auf, die jeweils einige Basenpaare neben der Stelle lagen, in die das PCR-Produkt eingefügt wurde. Durch einen präparativen Verdau mit EcoRI konnte das DNA-Insert aus dem Vektor pCR[®]2.1 herausgeschnitten werden.

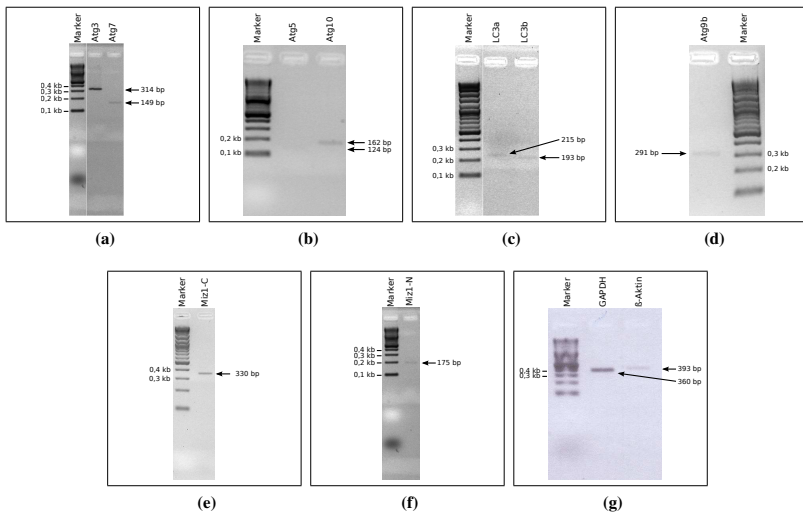


Abbildung 3.39: Aus dem Vektor pCR[®]2.1 isolierte DNA-Fragmente. Gelelektrophorese in 2%igen Agarosegelen der aus dem Vektor pCR[®]2.1 isolierten DNA-Fragmente von (a) Atg3 und Atg7, (b) Atg5 und Atg10, (c) LC3a und LC3b, (d) Atg9b, (e) Miz1-C, (f) Miz1-N und (g) GAPDH und β -Aktin. Die Bande von Atg5 ist auf dem Foto nicht zu erkennen. Sie ließ sich unter UV-Beleuchtung erahnen. Im weiteren Verlauf der Umklonierung konnte das DNA-Fragment von Atg5 wieder nachgewiesen werden. Als DNA-Größenstandard wurde TriDye[™] 2-Log verwendet.

Das Vorgehen und der Reaktionsansatz sind in Kapitel 2.2.3.6 auf Seite 44 beschrieben. Auf diese Weise konnte die Ziel-DNA-Sequenz mit Hilfe nur eines Enzyms aus dem Vektor geschnitten werden. Die DNA-Sequenz wurde dabei nur um einige wenige Basenpaare verlängert und das herausgeschnittene Fragment wies an beiden Enden eine Schnittstelle für EcoRI auf.

Mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese wurde der linearisierte Vektor und das herausgeschnittene Fragment voneinander getrennt und die Bande, die dem DNA-Fragment entsprach, wurde mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion aus dem Gel erfolgte wie in Kapitel 2.2.3.7 auf Seite 47 beschrieben.

Der Erfolg dieser Schritte wurde überprüft, indem das aus dem Gel isolierte DNA-Fragment in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und die Größe beurteilt wurde. Abbildung 3.39 auf Seite 96 zeigt die Ergebnisse der Gelelektrophorese der aus dem Vektor pCR[®]2.1 isolierten DNA-Fragmente.

3.3.2.2 Linearisierung des Bluescript-Vektors

Der Bluescript-Vektor musste zunächst linearisiert werden, um eine Ligation mit dem DNA-Stück zu ermöglichen. Damit das DNA-Stück in den Vektor integriert werden konnte, musste der Vektor außerdem mit dem gleichen Enzym geschnitten werden wie das DNA-Fragment, damit sie die gleichen Schnittstellen aufwiesen. Daher wurde der Vektor ebenfalls in einem präparativen Verdau mit EcoRI verdaut. Das Vorgehen ist in Kapitel 2.2.3.6 auf Seite 44 beschrieben. Da der Vektor mit Hilfe nur eines Enzyms linearisiert wurde, bestand die Möglichkeit, dass sich der Vektor wieder mit sich selbst ligierte. Da dies die Integration des DNA-Inserts unmöglich machen würde, wurde die Religation des linearisierten Vektors verhindert, indem der Vektor „gecippit“ wurde (Kapitel 2.2.3.6 auf Seite 44). Der Bluescript-Vektor wurde nach der Auftrennung im Agarosegel, wie in Kapitel 2.2.3.7 auf Seite 47 beschrieben, aus dem Gel extrahiert.

3.3.2.3 Klonierung der Ziel-DNA-Sequenzen in den Bluescript Vektor

Nachdem die DNA des Fragments sowie der linearisierte und gecippite Bluescript Vektor aus dem Agarosegel extrahiert worden waren, wurde das Fragment über die Schnittstelle EcoRI in die Multiple Cloning Site des Bluescript Vektors kloniert. Die Ligationsreaktion mit dem Bluescript-Vektor wurde wie in Kapitel 2.2.3.3 auf Seite 37 beschrieben durchgeführt. Nach der Transformation in E.coli erfolgte die weitere Kultivierung und Auswahl der Kolonien analog zum Vorgehen bei pCR[®]2.1 durch Zugabe von Ampicillin und Blau-Weiß-Selektionierung (Kapitel 2.2.3.4 auf Seite 40). Um zu überprüfen, ob die Kolonien das DNA-Fragment enthielten, wurde die Plasmid-DNA über eine Mini-Präparation isoliert (Kapitel 2.2.3.5 auf Seite 41) und ein Verdau mit EcoRI durchgeführt (Kapitel 2.2.3.6 auf Seite 44).

Durch den Verdau der Mini-Präparationen konnte gezeigt werden, ob in die EcoRI Schnittstelle des Vektors ein DNA-Fragment kloniert worden war und welche Größe es besaß. Allerdings war es nicht möglich auf diese Weise festzustellen, ob das DNA-Fragment lediglich die richtige Größe oder auch die gewünschte Basenfolge aufwies. Desweiteren konnte nicht unterschieden werden, ob das DNA-Stück einfach oder als Tandem im Vektor vorlag. Durch den Verdau sollten daher Klone vorselektioniert werden, die ein DNA-Fragment der erwarteten Größe aufgenommen hatten.

3 Ergebnisse

Die Basenfolge der DNA dieser Klone sollte dann durch eine Sequenzierung endgültig gesichert werden.

In Abbildung 3.40 sind die Ergebnisse des Verdauers der Mini-Präparationen der Kolonien für Atg3, Atg7, LC3a und LC3b dargestellt. Sowohl bei Atg3 als auch bei Atg7 wiesen alle drei der mit EcoRI verdauten Mini-Präparationen eine Bande in der erwarteten Größe von 314 bp (Atg3) bzw. 149 bp (Atg7) auf (Abb. 3.40a). Bei LC3a besaß von insgesamt fünf verdauten Klonen nur einer eine Bande in der erwarteten Größe von 215 bp (Abb. 3.40b), bei LC3b wiesen von acht Klonen nur zwei die gewünschte Bande (193 bp) auf (Abb. 3.40c).

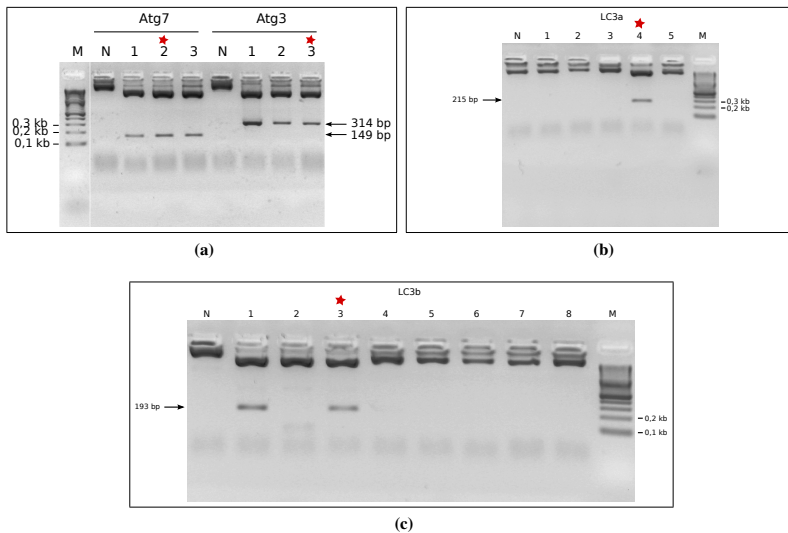


Abbildung 3.40: Verdau mit EcoRI der Mini-Präparationen des Bluescript-Vektors mit DNA-Insert. Gelelektrophorese der verdauten Mini-Präparationen in 2%igen Agarosegelen. Mini-Präparationen von (a) Atg7 und Atg3, (b) LC3a und (c) LC3b. Mit einem Stern versehen sind die Klone, deren DNA über eine Maxi-Präparation aufgereinigt und dann sequenziert wurde. Nach der Sequenzierung wurde die DNA dieser Klone für die Sondensynthese eingesetzt (rote Farbe des Sterns kennzeichnet Auswahl für Sondensynthese). Für jedes Gen wurde zusätzlich eine Nullkontrolle ohne Enzym angesetzt, gekennzeichnet durch „N“. Als DNA-Größenstandard wurde TriDye™ 2-Log verwendet („M“).

Von den Kolonien, bei denen die Größe des auf dem Gel aufgetragenen Fragments mit der errechneten Größe übereinstimmte, wurde jeweils eine ausgewählt, um DNA in großem Maßstab über eine Maxi-Präparation zu gewinnen (Kapitel 2.2.3.5 auf Seite 43). In Abbildung 3.40 sind die ausgewählten Klone mit einem Stern gekennzeichnet. Den Verdau der Maxi-Präparationen der ausgewählten Klone zeigt Abbildung 3.41 auf Seite 99. Die über die Maxi-Präparation gewonnene DNA dieser Kolonien wurde dann zum Sequenzieren geschickt. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind in Kapitel 3.3.3 auf Seite 101 dargestellt.

3 Ergebnisse

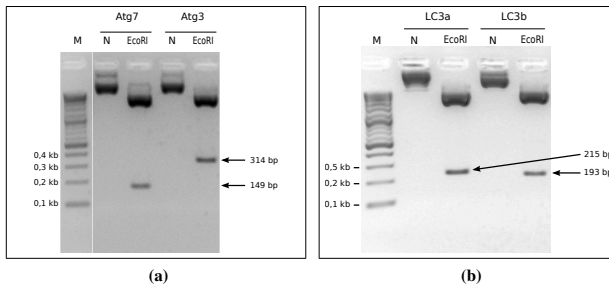


Abbildung 3.41: Verdau mit EcoRI der Maxi-Präparationen des Bluescript-Vektors mit DNA-Insert. Gelelektrophorese der verdauten Maxi-Präparationen in 2%igen Agarosegelen. Maxi-Präparationen von (a) Atg7 und Atg3, (b) LC3a und LC3b. Es handelt sich um die Klone, die in Abbildung 3.40 mit einem roten Stern markiert sind. Für jedes Gen wurde zusätzlich eine Nullkontrolle, also ein „Verdau“ ohne Enzym angesetzt, gekennzeichnet durch „N“. Als DNA-Größenstandard wurde TriDye™ 2-Log verwendet („M“).

Für die Gene Atg5, Atg9b, Atg10, Miz1-N, β -Aktin und GAPDH wurde das Vorgehen etwas geändert. Um die Trefferquote zu erhöhen, wurden von jedem Gen mehrere Klone zum Sequenzieren geschickt. Deshalb wurde die DNA mehrerer Kolonien, bei denen durch den Verdau mit EcoRI nachgewiesen werden konnte, dass sie ein DNA-Fragment der erwarteten Größe aufgenommen hatten, über das Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt und zum Sequenzieren geschickt. Nur von den Kolonien, bei denen durch die Sequenzierung die Integration des gewünschten DNA-Fragments gesichert war, wurde im Anschluß über eine Maxi-Präparation DNA in großer Menge isoliert. Abbildung 3.42 auf Seite 100 zeigt die Ergebnisse des Verdau der Mini-Präparationen der Gene Atg5, Atg9b, Atg10, Miz1-N, β -Aktin und GAPDH. Mit einem Stern versehen sind die Klone, die zum Sequenzieren geschickt wurden. Die rote Farbe der Sterne kennzeichnet die Klone, die nach der Sequenzierung für die Sondensynthese eingesetzt wurden.

Von Atg5 wurden fünf Klone mit EcoRI verdaut, wovon drei eine Bande in der erwarteten Größe aufwiesen (Abb. 3.42a). Zwei dieser Klone (Klon 2 und 3) wurden mittels des NucleoSpin® Plasmid Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt und zum Sequenzieren geschickt (in der Abbildung gekennzeichnet durch einen Stern).

Von Atg10 wiesen alle fünf verdauten Klone eine Bande der gewünschten Größe auf (Abb. 3.42a). Zunächst wurden Klon 1 und 4 für eine Sequenzierung ausgewählt. Da sich bei der Sequenzierung zeigte, dass bei beiden Klonen das DNA-Fragment als Tandem integriert worden war (Kapitel 3.3.3 auf Seite 101), wurde als nächstes DNA der Klone 2, 3 und 5 zum Sequenzieren geschickt.

Die zehn Klone von Atg9b wiesen ebenfalls alle die erwartete Bande von 291 bp auf (Abb. 3.42b). Es wurde DNA der Kolonien 1, 3, 5, 7 und 9 mittels des M.N.-Kits isoliert und sequenziert.

Durch einen Verdau der Mini-Präparationen von Miz1-N konnte bei den drei verdauten Klonen ein Fragment von 175 bp isoliert werden (Abb. 3.42c). Zunächst wurde Klon 1 für die weitere Verwendung ausgewählt. Da sich später bei einer Sequenzierung zeigte, dass es sich bei dem Klon um ein Tandem handelte, wurden auch Klon 2 und 3 sequenziert. Da auch bei diesen Klonen nicht

3 Ergebnisse

die gesuchte Basenfolge nachgewiesen werden konnte, wurden von den auf den Agarplatten aus-
gestrichenen Kolonien weitere 4 Klone gepickt (Klon a-d), über eine Mini-Präparation aufgereinigt
und mit EcoRI verdaut (Abb. 3.42d). Alle vier der verdauten Klone zeigten eine Bande von 175 bp,
wobei die Bande von Klon c schwach ausgeprägt war. Sie wurden alle zum Sequenzieren geschickt.

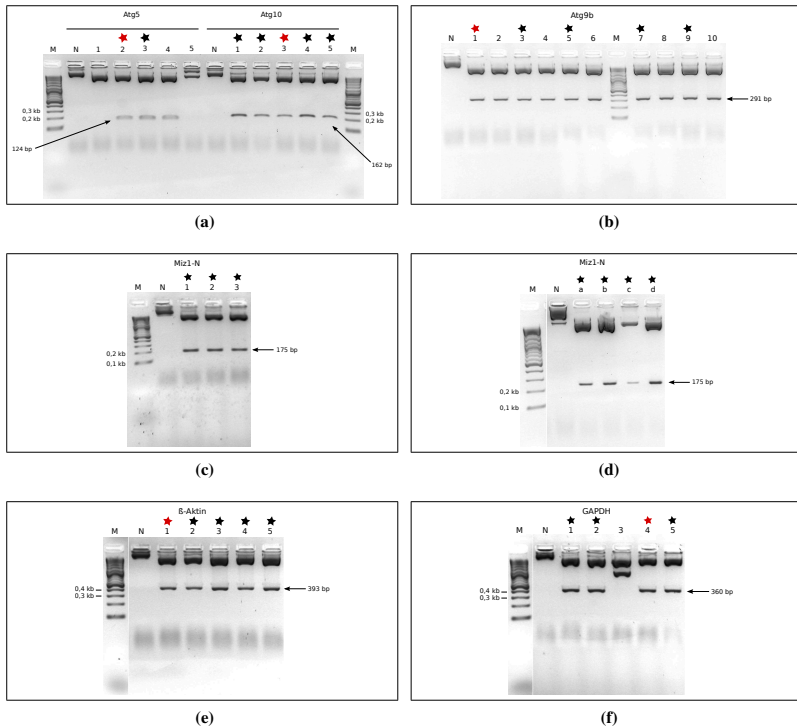


Abbildung 3.42: Verdau mit EcoRI der Mini-Präparationen des Bluescript-Vektors mit DNA-Insert. Gelelektrophorese der verdauten Mini-Präparationen in 2%igen Agarosegelen. Mini-Präparationen von (a) Atg5 und Atg10, (b) Atg9b, (c) Miz1-N₁, (d) Miz1-N₂, (e) β -Aktin und (f) GAPDH. Mit einem Stern versehen sind die Klone, die für eine Sequenzierung ausgewählt wurden. Der rote Stern kennzeichnet die Klone, deren DNA nach der Sequenzierung für die Sonden-synthese eingesetzt wurde. Für jedes Gen wurde zusätzlich eine Nullkontrolle ohne Enzym angesetzt, gekennzeichnet durch „N“. Als DNA-Größenstandard wurde TriDye™ 2-Log verwendet („M“).

Aus jedem der fünf Klone von β -Aktin und aus vier der fünf präparierten Klone von GAPDH konnte ein Fragment der richtigen Größe (393 bp für β -Aktin und 360 bp für GAPDH) isoliert werden (Abb. 3.42e und 3.42f). Alle vier Klone von β -Aktin und alle fünf von GAPDH wurden zum Sequenzieren geschickt.

Aus Zeitgründen war es leider im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich die Umklonierung des Gens Miz1-C in den Vektor pBluescript fertigzustellen.

3.3.3 Sequenzierungsergebnisse

Um genauere Informationen über das DNA-Stück zu bekommen, das in den Vektor pBluescript kloniert worden war, wurde, wie bereits oben erwähnt, eine Sequenzierung durchgeführt. Die Auswahl der Kolonien, die zum Sequenzieren geschickt wurden, ist in Kapitel 3.3.2.3 auf Seite 97 erläutert. Zusammenfassend lässt sich das Schema wie folgt beschreiben. Durch den Verdau mit EcoRI wurde eine Vorauswahl getroffen, indem überprüft wurde, ob in den Vektor ein DNA-Stück kloniert worden war und welche Größe es besaß. Von diesen Kolonien wurde DNA entweder über eine Mini-Präparation mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey-Nagel oder über eine Maxi-Präparation aufgereinigt und die DNA-Proben zum Sequenzieren geschickt (Seqlab, Göttingen).

Es bestanden drei Möglichkeiten, wie das DNA-Fragment in den Bluescript Vektor kloniert worden war. Es konnte in der Richtung vom 5' zum 3'-Ende integriert worden sein oder es konnte genau umgekehrt ausgerichtet sein. Außerdem bestand die Möglichkeit, dass es als Tandem im Plasmid vorlag, was bedeutet, dass es mehr als in einer Kopie in den Vektor aufgenommen worden war. Dies war möglich, da das Fragment nur mit einem Enzym (EcoRI) aus dem Vektor pCR®.2.1 herausgeschnitten worden war und die Schnittstellen folglich an beiden Enden des Fragments gleich waren. Die Enden konnten sich daher miteinander verbinden und das DNA-Stück konnte als Tandem in den Vektor integriert worden sein. Im Agarosegel konnte ein Tandem nicht von einem nur einfach vorliegenden Fragment unterschieden werden, da durch den Restriktionsverdau das Tandem ebenfalls zerschnitten wurde und als zwei Einzelteile gleicher Größe aufgetrennt wurde.

Atg3	<div>T7-Promotor → GATAAGCTTGATATCGAATTCCGGCTTAGTTTGGCAGCTGGAGATCACTTAGTCCAACCACTGTCCAACATGGCAATGGGCTACAGGGGAAGAATTGAAAGTGAAGGCATATCTTCGACAGACAAACAATTTTGGTAAACCAAAATGTTCCATGCTACAAGCGGTGTAAACAGATGGAGTATTTCGGATGAATTGGAAGATCATCTTGAAGAAGATGATGGTGATGGGGATGGGTAGATACATATCACACACAGGTATTTACAGGAATTACTGAAGCAGTTAAGGAGATTACACTGGAAGCAAGGACAGTATAAAATCCAAGATTGCTCAGCACTGAAGCCGAATTCCCTGCAGCCCGGGGG</div> <table><tr><th></th><th>Primer</th><th>Produktlänge (bp)</th><th>Accession Nr.</th><th>Ausrichtung</th></tr><tr><td>for</td><td>AGTTTGTGGCAGCTGGAGAT</td><td rowspan="2">314</td><td rowspan="2">NM_026402.3</td><td rowspan="2">T3 = anti-sense T7 = sense</td></tr><tr><td>rev</td><td>TCCAAGATTGCTCAGCACTG</td></tr></table>					Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung	for	AGTTTGTGGCAGCTGGAGAT	314	NM_026402.3	T3 = anti-sense T7 = sense	rev	TCCAAGATTGCTCAGCACTG
	Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung												
for	AGTTTGTGGCAGCTGGAGAT	314	NM_026402.3	T3 = anti-sense T7 = sense												
rev	TCCAAGATTGCTCAGCACTG															
Atg5	<div>T3-Promotor → CCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCTTGGAGAGAAGAGGCCAGGTGATGTTTCACGGGATAGAGCCAATGCTGGAAACCCCTCTGCAGTGGCTGAGCGAGCATCTGAGCTACCCAGATAAATCTTCTTCATATTAGCATTGTCCCCCAGCAAGCCGAATTCGATATCAAGCTTATCG</div> <table><tr><th></th><th>Primer</th><th>Produktlänge (bp)</th><th>Accession Nr.</th><th>Ausrichtung</th></tr><tr><td>for</td><td>GGAGAGAAGAGGCCAGGT</td><td rowspan="2">124</td><td rowspan="2">NM_053069.5</td><td rowspan="2">T3 = sense T7 = anti-sense</td></tr><tr><td>rev</td><td>TATTAGCATTGTCCCCCAGC</td></tr></table>					Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung	for	GGAGAGAAGAGGCCAGGT	124	NM_053069.5	T3 = sense T7 = anti-sense	rev	TATTAGCATTGTCCCCCAGC
	Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung												
for	GGAGAGAAGAGGCCAGGT	124	NM_053069.5	T3 = sense T7 = anti-sense												
rev	TATTAGCATTGTCCCCCAGC															
Atg7	<div>T7-Promotor → GATAAGCTTGATATCGAATTCCGGCTTCCACTGAGGTTACCATCCTCGGACCCATGCCTCTTTCTGGTTCTTCTCCAGCCAAACAGCTTTAGGACAATCTGGGCTAAATGCCATTTCTGGAAGTTCACTTCAAAGATGATGCTATGTGTCAAGTCTCTAGCTCCCTGCATGGTAAGCCGAATTCCTGCAGCCCGGGGG</div> <table><tr><th></th><th>Primer</th><th>Produktlänge (bp)</th><th>Accession Nr.</th><th>Ausrichtung</th></tr><tr><td>for</td><td>TCTCTAGCTCCCTGCATGGT</td><td rowspan="2">149</td><td rowspan="2">NM_028835.3</td><td rowspan="2">T3 = sense T7 = anti-sense</td></tr><tr><td>rev</td><td>CCACTGAGGTTCAACATCCT</td></tr></table>					Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung	for	TCTCTAGCTCCCTGCATGGT	149	NM_028835.3	T3 = sense T7 = anti-sense	rev	CCACTGAGGTTCAACATCCT
	Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung												
for	TCTCTAGCTCCCTGCATGGT	149	NM_028835.3	T3 = sense T7 = anti-sense												
rev	CCACTGAGGTTCAACATCCT															

... Fortsetzung

3 Ergebnisse

Fortsetzung ...

LC3a	<div>T7-Promotor → GATAAGCTTGATATCGAATTTCGGCTTGCCTGTCTCTGATAAGACCAAGTTTCTGGTCCAGACCATGTTAAACATGAGCGAGTTGGTC AAGATCATCTCCGGCGCCGCTGCAACTCAACCCACGACGGCTTCTTCTGATGGTGTCAACGACACAGCATGGTGAGCGTCTCCACAC CCATCGCTGACATCTATGAACAGGAGAAGGATGAAGACGGATTCTCTTACATGGTCTACGCTCC - AAGCGAATTCTCGACGCCGG GGG</div> <table><tr><th></th><th>Primer</th><th>Produktlänge (bp)</th><th>Accession Nr.</th><th>Ausrichtung</th></tr><tr><td>for</td><td>GCCTGTCTCTGNTAAGACCA</td><td rowspan="2">215</td><td rowspan="2">NM_025735.2</td><td rowspan="2">T3 = anti-sense T7 = sense</td></tr><tr><td>rev</td><td>CTACATGGTCTACGCTCC-</td></tr></table>					Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung	for	GCCTGTCTCTGNTAAGACCA	215	NM_025735.2	T3 = anti-sense T7 = sense	rev	CTACATGGTCTACGCTCC-
	Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung												
for	GCCTGTCTCTGNTAAGACCA	215	NM_025735.2	T3 = anti-sense T7 = sense												
rev	CTACATGGTCTACGCTCC-															
LC3b	<div>T7-Promotor → TGATGGATATCTGCAGAAATTCGGCTTCAGGAAGCCGTCTTCATCTCTCTCACTCTCGTACACTTCGGAGATGGGAGTGGACACACTCA CCATGCTGTGCCCATTCACAGGAGGAAGAAGGCTTGGTTAGCATTTAGGCTGCAAGCGCCGCTCTGATTATCTTGATGAGCTCGCTCAT GTTCACTGTGTGAGGACACAGGAACCTTGGTCTGTGCCAGGACGAAGCCGAATTCAGGACACTGGCGG</div> <table><tr><th></th><th>Primer</th><th>Produktlänge (bp)</th><th>Accession Nr.</th><th>Ausrichtung</th></tr><tr><td>for</td><td>ACTTGGTCTTGTCCAGGACG</td><td rowspan="2">193</td><td rowspan="2">NM_026160.4</td><td rowspan="2">T3 = sense T7 = anti-sense</td></tr><tr><td>rev</td><td>CAGGAAGCCGTCTTCATCT</td></tr></table>					Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung	for	ACTTGGTCTTGTCCAGGACG	193	NM_026160.4	T3 = sense T7 = anti-sense	rev	CAGGAAGCCGTCTTCATCT
	Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung												
for	ACTTGGTCTTGTCCAGGACG	193	NM_026160.4	T3 = sense T7 = anti-sense												
rev	CAGGAAGCCGTCTTCATCT															
Atg9b	<div>T3-Promotor → CCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCTTAGGAAGACCAACAGGGGACTGTGCTGGATCTTCTGTGCACACTGGGCGGAGGGTAGAATGGCA TCTGACAAGGTCACTTTGCTGTGTAATGGTCCACGCTCTTGATGGTCTTTGGTTGGTTGTTGAAGAGAACATTGTAATCCACGCAGC GAAGGAGGAAGGTTGTAAGGTGACAATGAAATGAACCTGCCCGAGCTGGAAGACATCTCCACAGGATACAGGCAAGCCATTCCG CTGATGATAGCTGTAGATCTTGTGAAAAA - CTGTCCAGGTTCTGGATGTGAAGCCGAATTCGATATCAAGCTTATCG</div> <table><tr><th></th><th>Primer</th><th>Produktlänge (bp)</th><th>Accession Nr.</th><th>Ausrichtung</th></tr><tr><td>for</td><td>TGTCCAGGTTCTGGATGTGA</td><td rowspan="2">291</td><td rowspan="2">NM_001002897.3</td><td rowspan="2">T3 = anti-sense T7 = sense</td></tr><tr><td>rev</td><td>AGGAAGACCAACAGGGGACT</td></tr></table>					Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung	for	TGTCCAGGTTCTGGATGTGA	291	NM_001002897.3	T3 = anti-sense T7 = sense	rev	AGGAAGACCAACAGGGGACT
	Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung												
for	TGTCCAGGTTCTGGATGTGA	291	NM_001002897.3	T3 = anti-sense T7 = sense												
rev	AGGAAGACCAACAGGGGACT															
Atg10	<div>T3-Promotor → CCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCTTGCAGGTCTCGTCACTTCAGAAATCATCCATTGGTAGCTCTAAATTCTCTCTGTAGGGAGACA TGTGAGCACACTGGCATGTGGTGTCAAGGTCTCATTTCTTTATTTCGAAACTGTGTTTGCACATGTAGCCATCAGAACATCTCTTGGCT GTTCTCCATTCAAGCCGAATTCGATATCAAGCTTATCG</div> <table><tr><th></th><th>Primer</th><th>Produktlänge (bp)</th><th>Accession Nr.</th><th>Ausrichtung</th></tr><tr><td>for</td><td>TCCTTGGCTGTTCTCCATTCT</td><td rowspan="2">162</td><td rowspan="2">NM_025770.3</td><td rowspan="2">T3 = anti-sense T7 = sense</td></tr><tr><td>rev</td><td>TGCAGGTCTCGTCACTTCAG</td></tr></table>					Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung	for	TCCTTGGCTGTTCTCCATTCT	162	NM_025770.3	T3 = anti-sense T7 = sense	rev	TGCAGGTCTCGTCACTTCAG
	Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung												
for	TCCTTGGCTGTTCTCCATTCT	162	NM_025770.3	T3 = anti-sense T7 = sense												
rev	TGCAGGTCTCGTCACTTCAG															
β-Aktin	<div>T3-Promotor → CCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCTTGTGTACCAACTGGGACGACATGGNAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCGT GTGGCCCTTGAGGAGCACCCCTGTGCTGCTCACCGAGGCCCCCTGAACCGTAAGGCCAACCGTGAAAGATGACCCAGATCATGTTTG AGA CCTTCAACACCCAGCCATGTACGTAGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTATGCCTCTGGCTGTACCAAGCAGCATTGTGATGA CTCCGGAGACGGGGTCAACCACACTGTGCCATCTACGAGGGCTATGCTCTCCCTCAAGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGG GACCTGACAGACTACCTCATGAAGATCCTGACCGAGCGTGGCTACAGCTTACCAACACAGCTGAGAGAGNCGAATTCGATATCAAG CTTATCG</div> <table><tr><th></th><th>Primer</th><th>Produktlänge (bp)</th><th>Accession Nr.</th><th>Ausrichtung</th></tr><tr><td>for</td><td>TGTTACCAACTGGGACGACA</td><td rowspan="2">393</td><td rowspan="2">NM_007393.3</td><td rowspan="2">T3 = sense T7 = anti-sense</td></tr><tr><td>rev</td><td>TTCACCACACAGCTGAGAG</td></tr></table>					Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung	for	TGTTACCAACTGGGACGACA	393	NM_007393.3	T3 = sense T7 = anti-sense	rev	TTCACCACACAGCTGAGAG
	Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung												
for	TGTTACCAACTGGGACGACA	393	NM_007393.3	T3 = sense T7 = anti-sense												
rev	TTCACCACACAGCTGAGAG															

...Fortsetzung

3 Ergebnisse

Fortsetzung ...

GAPDH	T3-Promotor → CCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCTTCCCTGTTGCTGTAGCCGTATTCATTGTCATACCGAAATGAGCTTGACAAAGTTGTCATTGA GAGCAATGCCAGCCCCGGCATCGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTGTAAGTCGCAGGAGACAACCTGGTCCTCAGTTAGCCCAA GATGCCCTTCAGTGGGCCCTCAGATGCCTGCTTCACCACTTCTTGATGTCATCACTTGGCAGGTTTCTCCAGGCGGCACGTCAGA TCACAGCGGACACATTGGGGTAGGAGCAGGAAGGCCATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGCTCTGGGATGACCTTGCCCAAGCAGCCT TGGCAGCACCACTGGATGCAGGGATGATGTCTTAAGCCGAATTCGATATCAAGCTTATCG			
	Primer	Produktlänge (bp)	Accession Nr.	Ausrichtung
	for <u>GGATGCAGGGATGATGTTCT</u> rev <u>CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT</u>	360	NM_008084.2	T3 = anti-sense T7 = sense

Tabelle 3.1: Sequenzen der Klone, die für die Sondensynthese ausgewählt wurden. In rot ist jeweils der forward-Primer, in blau der reverse-Primer dargestellt. Unterstrichen sind die DNA-Abschnitte, die der Sequenz des Bluescript Vektors entsprechen. Grün markiert sind die Basen, die falsch integriert wurden und nicht der Sequenz des jeweiligen Gens entsprechen und mit einem grünen Bindestrich sind Lücken gekennzeichnet, in denen eine Base ausgelassen wurde. Die Basenfolge der sequenzierten DNA-Stränge wurde über die Seite des NCBI mit der Sequenz des jeweiligen Gens verglichen. Die Referenznummer der Gene mit denen verglichen wurde, ist unter 'Accession Nr.' angegeben. Wie das DNA-Fragment im Bluescript-Vektor ausgerichtet ist und ob die Transkription mit T3-Polymerase sense oder anti-sense Sonden erzeugt, kann der Spalte „Ausrichtung“ entnommen werden. Für die Transkription mit T7-Polymerase gilt dann jeweils das Gegenteil. Die Sequenz des Bluescript Vektors für den Klon LC3b scheint lückenhaft. Dies ist auf ein technisches Problem bei der Sequenzierung zurückzuführen, die Sequenz ist daher grau hinterlegt.

Durch die Sequenzierung wurde die Basenfolge des DNA-Inserts überprüft. Außerdem wurde die Ausrichtung des Fragments im Vektor bestimmt. Die ermittelten Sequenzen der Proben wurden über die Seite des NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit der Gensequenz, die unter der Accession Nummer angegeben ist, abgeglichen. Tabelle 3.1 zeigt die Ergebnisse der Sequenzierung der Klone, die für die Sondensynthese ausgewählt wurden. Die vollständigen Sequenzen und das Ergebnis des Alignments mit der unter der Accession Nr. angegebenen Gensequenz sind im Anhang auf der beiliegenden CD (Ordner Sequenzen) zu finden. Ebenfalls der CD (Ordner Sequenzen) zu entnehmen sind die Sequenzierungsergebnisse der Klone, die nicht weiter verwendet wurden.

Konnte durch die Sequenzierung nachgewiesen werden, dass das DNA-Fragment die gewünschte Basenfolge aufwies und zudem einfach in dem Vektor vorlag (kein Tandem), wurde eine große Menge DNA durch eine Maxi-Präparation aufgereinigt. In Abbildung 3.43 auf Seite 104 ist der Verdau mit EcoRI der Maxi-Präparationen der mit Hilfe der Sequenzierung ausgewählten Kolonien dargestellt. Für die Gene Atg3, Atg7, LC3a und LC3b wurden bereits vor der Sequenzierung Maxi-Präparationen angefertigt, sie sind in Abbildung 3.41 auf Seite 99 abgebildet.

Von Miz1-N konnte bei der Sequenzierung bei keinem der Klone die erwartete Basenfolge nachgewiesen werden. Von diesem Gen stand daher keine DNA für eine Maxi-Präparation und anschließende Sondensynthese zur Verfügung. Aus Zeitgründen war es ebenfalls nicht möglich, die Umklonierung für das Gen Miz1-C fertigzustellen, sodaß von diesem Gen ebenfalls keine DNA für die Maxi-Präparation und Sondensynthese vorhanden war.

3 Ergebnisse

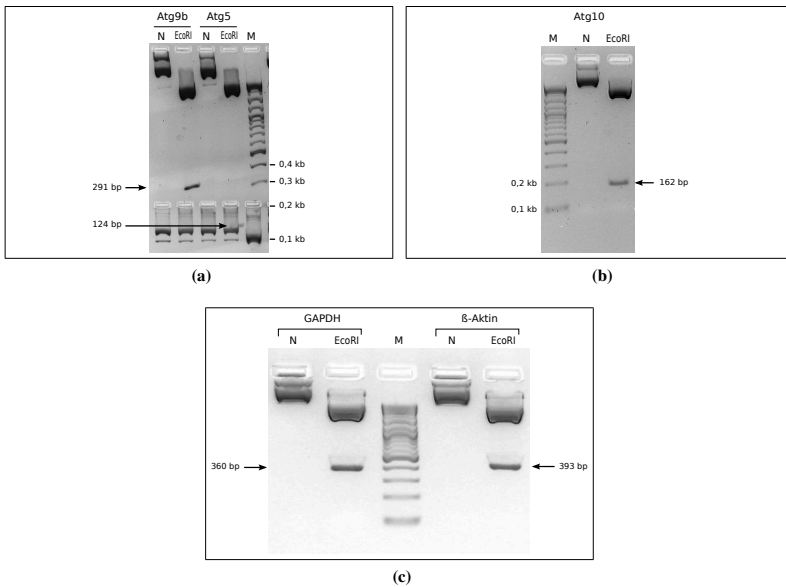


Abbildung 3.43: Verdau mit EcoRI der Maxi-Präparationen des Bluescript-Vektors mit DNA-Insert. Gelelektrophorese der verdauten Maxi-Präparationen in 2%igen Agarosegelen. Maxi-Präparationen von (a) Atg9b und Atg5, (b) Atg10, (c) GAPDH und β -Aktin. Für jedes Gen wurde zusätzlich eine Nullkontrolle, also ein „Verdau“ ohne Enzym angesetzt, gekennzeichnet durch „N“. Als DNA-Größenstandard wurde TriDye™ 2-Log verwendet („M“).

3.3.4 Synthese von sense und antisense RNA-Sonden

Die über eine Maxi-Präparation isolierte Plasmid-DNA diente als Vorlage für die *in vitro* Synthese von mit Digoxigenin markierten RNA-Strängen. Für die Herstellung von sense und anti-sense Sonden war es nötig, einmal mit T3- und einmal mit T7-RNA-Polymerase zu transkribieren. Durch einen Verdau mit HindIII und der Transkription mit T3-RNA-Polymerase wurde die DNA-Matrize in die eine Richtung transkribiert, durch den Verdau mit SmaI und Transkription mit T7-RNA-Polymerase entstand ein gegenläufiger RNA-Strang. Welche Richtung die sense Sonde ergab und welche anti-sense, hing davon ab in welcher Richtung das DNA-Fragment in den Bluescript-Vektor kloniert worden war und konnte durch die Sequenzierung des in den Bluescript-Vektor klonierten DNA-Stücks bestimmt werden.

Für die Synthese der Sonden wurden die Maxi-Präparationen des Bluescript-Vektors mit DNA-Insert in einem enzymatischen Verdau mit HindIII oder SmaI linearisiert (siehe Kapitel 2.2.3.6 auf Seite 44). Zur Kontrolle des linearisierten Vektors wurde dieser neben der unverdauten Plasmid-DNA in einer Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Ergebnisse für GAPDH und β -Aktin zeigt Abbildung 3.44 auf Seite 105. Nach Linearisierung des Bluescript-Vektors erfolgte die in

3 Ergebnisse

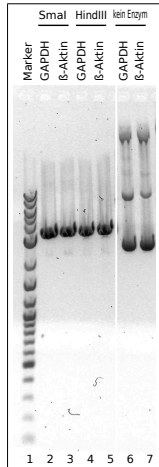


Abbildung 3.44: Gelelektrophorese des Vektors pBluescript mit DNA-Insert β -Aktin und GAPDH. In den Spuren 2-5 ist der mit HindIII bzw. SmaI verdauter Vektor aufgetragen. Die Spuren 6 und 7 zeigen den Gellauf des unverdauten Bluescript Vektors. Aufgrund des größeren Stokes-Radius laufen die Proben des verdauten und damit linearisierten Vektors (Spur 2-5) in der Elektrophorese langsamer als die Proben des unverdauten, zyklischen Vektors (Spur 6 und 7). Verdau mit HindIII zur Vorbereitung der *in vitro* Transkription mit T3-Polymerase. Linearisierung mit SmaI für die Transkription mit T7-Polymerase. Auftrennung in 0,75%igem Agarosegel. Als Marker wurde TriDye™ 2-Log verwendet.

in vitro Transkription mit T3-RNA-Polymerase bei mit HindIII verdauter Plasmid-DNA oder mit T7-RNA-Polymerase bei mit SmaI geschnittenem Vektor (Kapitel 2.2.3.8 auf Seite 47).

Im Rahmen dieser Arbeit war es leider nicht möglich, für alle Gene Sonden herzustellen. Aus Zeitgründen konnten nur Sonden für die Gene GAPDH und β -Aktin fertiggestellt werden. Ebenfalls konnte der RNase Protection Assay nicht mehr durchgeführt werden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Relevanz Miz1 für die Autophagie hat.

Miz1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression zahlreicher Gene beeinflusst und auf diese Weise wichtige Funktionen unter anderem in der Zelldifferenzierung und der Regulation der Zellproliferation übernimmt [Gebhardt et al., 2007; Herold et al., 2002; Peukert et al., 1997; Staller et al., 2001; van de Wetering et al., 2002]. Dabei interagiert Miz1 mit verschiedenen Partnern und vollbringt im komplexen Zusammenspiel mit diesen seine biologische Aufgabe (für eine detaillierte Beschreibung des Transkriptionsfaktors Miz1 siehe Kapitel 1.2 auf Seite 13).

Über die Regulation des autophagischen Prozesses ist bereits einiges bekannt. Es sind in der Literatur zahlreiche Signalwege beschrieben, die den autophagischen Prozess regulieren bzw. zur Initiation der Autophagosomenbildung beitragen [Burman and Ktistakis, 2010; He and Klionsky, 2009; Ravikumar et al., 2010; Wang and Levine, 2010]. Die Regulation der Autophagie kann dabei auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Signalkaskaden, die oberhalb der Autophagiemaschinerie wirken, sind ebenso an einer Regulation beteiligt, wie Faktoren, die zur Autophagosomenbildung, zu ihrer Reifung und zur Verschmelzung mit Lysosomen beitragen [Mehrpour et al., 2010b]. Über einen Einfluss von Miz1 auf die Autophagie gibt es bislang allerdings keine wesentlichen Erkenntnisse. Es gibt erste Hinweise, dass Miz1 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor unter anderem auch die Expression Autophagie-assoziiierter Gene beeinflusst [Müller, 2008]. Zudem konnte in Zellen ohne funktionstüchtigem Miz1 ein Autophagiedefekt beobachtet werden [Müller, 2008].

Um zu untersuchen, ob zu den durch Miz1-vermittelten Effekten auch Prozesse gehören, die auf den Mechanismus der Autophagie wirken, wurden Wildtyp MEFs verglichen mit MEFs, in denen die POZ-Domäne des Miz1 Proteins ausgeknockt war (Δ POZ MEFs). Die POZ-Domäne ist für die Funktion von Miz1 essentiell [Herold et al., 2002; Peukert et al., 1997]. Unter anderem wird über sie eine Homodimerisierung zweier Miz1-Moleküle vermittelt [Stead et al., 2007; Stogios et al., 2010]. Es gibt Hinweise, dass sich Miz1 in Lösung immer als Homodimer verhält und dass Miz1 nicht als Monomer oder in einer höhergradigen Assoziation vorkommt [Stogios et al., 2010]. Das bedeutet, dass Miz1 bei Ausfall der POZ-Domäne nicht mehr dimerisieren kann und folglich die Funktion von Miz1 gestört ist. In den folgenden Kapiteln wird daher anstelle von fehlender Miz1 POZ-Domäne auch von fehlendem Miz1 gesprochen.

Es sollten sowohl Genexpressionsmessungen als auch morphologische Analysen durchgeführt werden. Es wurden zwei Methoden ausgewählt, die auf unterschiedliche Art und Weise Genexpressionen in Zellen quantifizieren können. Bei diesen handelte es sich um die qPCR und den RNase Protection Assay. Die beiden Methoden ermöglichen äquivalente Expressionsanalysen. Die mittels qPCR gewonnenen Ergebnisse sollten mit den Resultaten des RNase Protection Assays verglichen werden. Da der RNase Protection Assay nicht mehr etabliert werden konnte, war es nicht mög-

lich, die in der qPCR gewonnenen Ergebnisse mit einer zweiten Methode zu verifizieren. Die hier vorgestellten Daten beruhen demnach auf quantitativen Messungen mit der qPCR.

4.1 Einfluss von Autophagiestimulation auf die Expression von Miz1

In zwei Diplomarbeiten war bereits gezeigt worden, dass Δ POZ MEFs im Vergleich zu Wildtyp MEFs bei Inkubation mit AS-armem Medium (EBSS) eine erhöhte Sterblichkeit aufweisen [Müller, 2008; Oppenheimer, 2009]. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Transkriptionsfaktor Miz1 an der Anpassung an nährstoffarme Bedingungen beteiligt ist. Um zu untersuchen, ob der Entzug von Aminosäuren auch einen Einfluss auf die Genexpression von Miz1 hat, wurden Expressionsmessungen von Miz1 in Wildtyp- und Δ POZ 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} durchgeführt (zu den verwendeten Zelllinien siehe Kapitel 2.1.6 auf Seite 25).

Die Untersuchung von 3T3 MEFs ergab, dass die Expression von Miz1 nach Aminosäureentzug induziert wird. In Wildtypzellen war im Vergleich zu unter Vollmedium-Bedingungen kultivierten Wildtypzellen nach Aminosäureentzug eine Induktion der Genexpression von Miz1 zu verzeichnen. Die Expression des trunkierten Miz1 stieg in Δ POZ Zellen nach der Inkubation mit EBSS ebenfalls an. Diese Ergebnisse waren in beiden durchgeführten Messungen gleich (Abbildung 3.2 auf Seite 58). Die Expression von Miz1 scheint somit durch Aminosäureentzug verstärkt zu werden. Die beiden Messungen in MEFs^{ARF} konnten diese Resultate bestätigen. Auch in diesen Zellen stieg die Expression von Miz1 in Wildtyp und Δ POZ MEFs nach der Inkubation mit EBSS an. Der Anstieg der Genexpression war allerdings deutlich stärker als in 3T3 MEFs (Abbildung 3.11 auf Seite 67). Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen aus einer Diplomarbeit [Oppenheimer, 2009], in der ebenfalls eine Induktion der Genexpression von Miz1 in 3T3 MEFs nach AS-Entzug nachgewiesen werden konnte.

Auffällig war, dass sich die Expression von Miz1 unter DMEM-Bedingungen zwischen Wildtyp- und Δ POZ Zellen unterschied. In mit DMEM inkubierten 3T3 MEFs lag die Genexpression von Miz1 in Δ POZ Zellen höher als in Wildtypzellen, in MEFs^{ARF} war sie in Δ POZ Zellen niedriger als in Wildtypzellen (für eine detailliertere Diskussion der unterschiedlichen Ergebnisse in 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} siehe Kapitel 4.3.4 auf Seite 120). Dies überrascht, da der Knockout der POZ-Domäne die Expression von Miz1 nicht beeinflussen und die Expression somit in beiden Zelltypen gleich sein sollte. Es wäre möglich, dass die Genexpression des trunkierten Miz1 anders reguliert wird als die Expression des Wt-Miz1. Es wäre zum Beispiel denkbar, dass Miz1 selbst an der Regulation seiner Expression beteiligt ist. Dies könnte direkt oder indirekt über zwischengeschaltete Transkriptionsfaktoren geschehen. Demnach könnte die veränderte Funktion des trunkierten Miz1 dazu führen, dass in einem Feedback Mechanismus die Transkription des Gens *Miz1* induziert wird und auf diese Weise die Menge des Proteins Miz1 gesteigert wird. Dies könnte ein Versuch der Zelle sein, die beeinträchtigte Funktion des trunkierten Miz1 durch eine Steigerung der Proteinmenge auszugleichen. Gründe für die unterschiedlich hohen Miz1 Genexpressionen in Wildtyp und Δ POZ Zellen könnten aber auch Mutationen sein, die bei der Passagierung der Zellen entstanden sein

könnten. Da die Wildtyp- und die Knockout Zellen unterschiedlichen Zelllinien angehören, könnten sie unterschiedliche Mutationen aufweisen, die einen Einfluss auf die Regulation von Miz1 nehmen. In 3T3 MEFs könnten die Unterschiede zusätzlich auf Mutationen zurückzuführen sein, die im Rahmen der Immortalisierung entstanden sind (siehe auch Kapitel 2.1.6 auf Seite 25). Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeiten, die sich aus unterschiedlichen Zelllinien ergeben, zu umgehen, wäre die Durchführung der Versuche mit primären embryonalen Mausfibroblasten. Diese könnten zeitnah nach ihrer Isolierung eingesetzt werden, wodurch die Probleme der Immortalisierung und Passagierung vermieden werden könnten.

Insgesamt geben die Ergebnisse einen starken Hinweis dafür, dass die Expression von Miz1 durch Aminosäureentzug induziert wird. Da es sich jedoch um nur jeweils zwei Messwiederholungen handelte und aus diesem Grund keine statistische Auswertung erfolgen konnte, wäre es sinnvoll, die Resultate anhand weiterer Messwiederholungen zu bestätigen. Eine alternative Methode, um die Genexpression von Miz1 zu untersuchen, wäre ein Reporter Assay. Mit Hilfe dieses Verfahrens könnte auch untersucht werden, welche anderen Faktoren außer der Inkubation mit EBSS die Expression von Miz1 induzieren könnten.

4.2 Morphologische Unterschiede von MEFs mit oder ohne funktionstüchtigem Miz1 in Hinblick auf das lysosomal-autophagische Kompartiment

Wie im vorangegangenen Kapitel diskutiert, steigert die Behandlung mit EBSS die Expression von Miz1 in 3T3 MEFs und MEFs^{ARF}. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass Miz1 eine Rolle in der Regulation des autophagischen Prozesses übernimmt. Die auf Genexpressionsebene gefundenen Hinweise sollten nun durch morphologische Untersuchungen ergänzt werden. In der Arbeitsgruppe konnten anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen bereits Defekte der Autophagie in Δ POZ-Knockout Zellen auf morphologischer Ebene nachgewiesen werden [Müller, 2008]. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie, die genauere morphologische Analysen ermöglicht, wurde nun die Rolle von Miz1 auf die Morphologie embryonaler Mausfibroblasten untersucht, indem elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit pB- \emptyset oder pB-Miz1 infizierten Δ POZ 3T3 MEFs vergleichend ausgewertet wurden. Dieser Ansatz wurde gewählt, um direkt vergleichbare Zellen zu untersuchen und nicht zwei Zelllinien, deren genaue Konstitution unbekannt ist (siehe Kapitel 2.1.6 auf Seite 25 und Kapitel 2.2.1.4 auf Seite 28). Die Immundetektionen von Miz1, die für das zweite und dritte Experiment der Infektion von 3T3 MEFs durchgeführt wurden, beweisen, dass die mit pB-Miz1 infizierten Δ POZ 3T3 MEFs das humane Miz1 auf Proteinebene überexprimierten (Kapitel 3.2.1 auf Seite 74).

Im Allgemeinen wird die Anzahl autophagischer Vakuolen als Indikator für die Aktivität der Autophagie verwendet [Mizushima et al., 2010]. Eine Zunahme autophagischer Vakuolen nach EBSS-Stimulation als Zeichen einer Induktion der Autophagie durch EBSS konnte auch in dieser Arbeit festgestellt werden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der Schluß von einer erhöhten Anzahl autophagischer Strukturen auf eine Zunahme der Aktivität der Autophagie auch fehlerhaft

sein kann. Eine Zunahme autophagischer Vesikel kann auch auf eine Unterbrechung des autophagischen Kreislaufs zurückzuführen sein. So würde z. B. eine behinderte Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen eine Anhäufung autophagischer Vesikel aller Reifungsstufen auslösen, während die Zahl an Autolysosomen (das heißt Autophagosomen, die mit einem Lysosom fusioniert sind) gering wäre [Mizushima et al., 2010].

Die durchgeführten Experimente bestätigen die Vermutung, Miz1 könnte an der Regulation des autophagischen Prozesses in Mausfibroblasten beteiligt sein. Der Vergleich der mit Vollmedium inkubierten Zellen, die das vollständige, nicht trunkierte Miz1 enthielten, mit solchen, die das trunkierte Miz1 ohne POZ-Domäne aufwiesen, legt nahe, dass Miz1 an der Regulation basaler Autophagie beteiligt ist. Die Unterschiede zwischen Δ POZ 3T3 MEFs, die mit dem Leervektor infiziert wurden, und solchen, die mit hMiz1 substituiert wurden, betreffen vor allem das Auftreten von in dieser Arbeit als Typ III Vakuolen bezeichneten autophagischen Vakuolen in den Zellen ohne funktionstüchtigem Miz1 (Abbildung 3.33 auf Seite 90 und Abbildung 3.34 auf Seite 91). Typ III Vakuolen enthalten eine große Menge elektronendichten Materials, das aus membranhaltigen Strukturen und unverdaulichen zytoplasmatischen Bestandteilen besteht (Abbildung 3.32 auf Seite 89). Dies veranlasst zu der Vermutung, dass die Zelle aufgrund einer Blockierung des autophagischen Prozesses nicht dazu in der Lage ist, das sequestrierte Material abzubauen. An welcher Stelle der Autophagosomenreifung die Störung eintritt und ob sie auch die Fusion mit Lysosomen betrifft, kann in dieser Arbeit nicht differenziert werden. Die Substitution von humanem, nicht trunkiertem Miz1 scheint den autophagischen Fluss wiederherzustellen. Das Auftreten von Typ II Vakuolen anstelle von Typ III Vakuolen in Δ POZ MEFs, die mit pB-Miz1 infiziert wurden (Abbildung 3.33 auf Seite 90 und Abbildung 3.34 auf Seite 91), lässt darauf schließen, dass mit der Substitution von Miz1 auch die Fähigkeit zur Autophagosomenreifung wiederhergestellt wird. Diesen Ergebnissen zufolge ist Miz1 an der Regulation der Autophagosomenreifung beteiligt und fördert während normaler, basaler Autophagie den Fluss durch den autophagischen Kreislauf.

Auffällig ist, dass die Inkubation mit EBSS dazu führt, dass keine Typ III Vakuolen mehr in MEFs ohne POZ-Domäne nachgewiesen werden können (Abbildung 3.33 auf Seite 90 und Abbildung 3.34 auf Seite 91). Das bedeutet, dass die Inkubation mit EBSS wie erwartet eine Veränderung der Autophagie bewirkt. Hierfür spricht ebenfalls die bereits oben angesprochene Zunahme der Anzahl an autophagischen Vakuolen insgesamt. Neben Typ I Vakuolen, die in allen Zellen nachgewiesen werden konnten, waren in Zellen ohne Miz1 nach der Inkubation mit EBSS nun vor allem Typ II Vakuolen vorzufinden, während Typ III Vakuolen nicht nachgewiesen werden konnten. Man kann daraus schlussfolgern, dass die Blockierung des autophagischen Prozesses durch die Inkubation mit EBSS aufgehoben werden konnte. Dies würde bedeuten, dass Typ III Vakuolen bei raschem Umsatz autophagischer Vakuolen während einer stimulierten Autophagie lediglich als kurzes Zwischenstadium in den Zellen gebildet werden und dass sie aufgrund ihres kurzen zeitlichen Auftretens in den ausgewerteten elektronenmikroskopischen Momentaufnahmen nicht angetroffen wurden. Das heißt, dass bei Zellen ohne Miz1 zum Einen die Substitution von Miz1 zum Anderen aber auch die Inkubation mit EBSS die Fähigkeit zur Autophagosomenreifung wiederherzustellen vermag.

Die elektronenmikroskopische Beurteilung autophagischer Vakuolen gestaltet sich häufig schwierig, da die einzelnen Stadien nicht immer voneinander oder von anderen Strukturen abgegrenzt

werden können [Eskelinen, 2008b; Mizushima et al., 2010]. Außerdem muss bei der Interpretation von Ergebnissen, die in der Elektronenmikroskopie gewonnen wurden, berücksichtigt werden, dass es sich um eine statische Methode handelt, die eine Momentaufnahme einer Zelle darstellt und die Dynamik der Autophagie schlecht erfassen kann. Zudem birgt sie die Schwierigkeit, dass von der Morphologie nicht direkt auf die Funktion geschlossen werden kann [Mizushima et al., 2010]. Diese Unsicherheiten müssen bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden.

Zusätzlich darf nicht außer Acht gelassen werden, dass nicht mit Sicherheit auszuschließen ist, dass sich die Funktion und Wirkungsweise des humanen Miz1 von dem murinen Miz1 unterscheidet. Zwar besteht eine 92%ige Homologie zwischen den beiden Proteinen [Peukert et al., 1997], dennoch ist es möglich, dass das humane Miz1 seine Wirkung in Mausfibroblasten anders entfaltet, als in humanen Zellen. Eine Alternative zur Substitution von hMiz1 in Δ POZ Zellen wäre, murines Miz1 in Wildtyp MEFs zu inhibieren. Über einen siRNA vermittelten Knockdown wäre es möglich, Wildtyp *Miz1* auszuschalten und auf diese Weise Zellen ohne Miz1 zu generieren. Der Vorteil wäre, dass die Vergleiche ebenfalls innerhalb Zellen einer Zelllinie gezogen werden würden. Ein Nachteil wäre, dass über einen Knockdown keine vollständige Suppression von Miz1 erreicht werden könnte.

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass Autophagie im stimulierten Zustand anders reguliert wird als unter basalen Bedingungen. Es konnte gezeigt werden, dass Miz1 während normaler, basaler Autophagie eine wichtige Rolle in der Regulation übernimmt. Während stimulierter Autophagie scheinen andere, noch unbekannte Faktoren an der Regulation beteiligt zu sein, so dass in diesem stimulierten Zustand auch bei Fehlen von Miz1 die Reifung autophagischer Vakuolen möglich ist. Ein Hinweis dafür, dass Miz1 auch während stimulierter Autophagie eine, wenn auch untergeordnete Rolle spielen könnte, ist die Tatsache, dass die Morphologie mit pB- \emptyset und pB-Miz1 infizierter MEFs nach Inkubation mit EBSS nicht identisch ist. Typ II Vakuolen mit sehr großen Lumina, die charakteristischerweise in den mit hMiz1 substituierten MEFs nach EBSS-Stimulation zu finden waren (Abbildung 3.35 auf Seite 92), konnten in den mit dem Leervektor infizierten Vergleichszellen nach EBSS Inkubation nicht nachgewiesen werden. In diesen Zellen waren zwar auch Typ II Vakuolen vorhanden, die Größe der Lumina erreichte aber nicht die Größe, wie einige der Typ II Vakuolen in mit pB-Miz1 infizierten Δ POZ 3T3 MEFs (Abbildung 3.34 auf Seite 91).

4.3 Einfluss von Miz1 auf die Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene

Die Stimulation zur Autophagie ruft eine Veränderung der Miz1-Genexpression hervor. Auch auf morphologischer Ebene konnte gezeigt werden, dass Zellen mit oder ohne funktionstüchtigem Miz1 Unterschiede in der Autophagosomenreifung aufweisen bzw. unterschiedlich auf AS-Entzug reagieren (Kapitel 3.2.3 auf Seite 85). Das bedeutet, dass ein Einfluß von Miz1 auf die Autophagie sehr wahrscheinlich ist. Es sollte nun untersucht werden, auf welche Art und Weise Miz1 Autophagie reguliert bzw. welchen Teilschritt des autophagischen Prozesses Miz1 beeinflusst. Eine Möglichkeit

der Autophagieregulation ist die Modifikation der Expression der für die Konjugationssysteme der Autophagie wichtigen Gene.

In der Literatur sind zum Teil bereits Interaktionspartner von Atg-Genen bekannt, die über diese vermittelt das Maß an Autophagie regulieren können. So konnte vor Kurzem mit der Aufklärung der Abhängigkeiten zwischen Atg9, p38IP und p38 α ein Mechanismus zur Regulation der Autophagie, an der ein Atg-Protein direkt beteiligt ist, aufgedeckt werden [Webber and Tooze, 2010a]. Auch Bif-1 reguliert über Atg9 die Autophagosomenbildung, indem es für die Bereitstellung Atg9-haltiger Membranen sorgt [Takahashi et al., 2011]. Aber auch die Modifizierung von Atg-Proteinen durch z. B. Phosphorylierungen, Oxidierungen, Azetylierungen oder proteolytischen Abspaltungen sowie Protein-Interaktionen tragen durch Veränderungen der Funktion von Atg-Proteinen zur Autophagieregulation bei [Mehrpour et al., 2010b].

Über die Faktoren, die an der Regulation der Expression Autophagie-assoziiierter Gene beteiligt sind, ist bislang wenig bekannt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, E2F1, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) oder Mitglieder der FoxO Proteinfamilie die Transkription bestimmter Atg-Gene direkt beeinflussen können [Mehrpour et al., 2010b]. Auch für die MAP-Kinase c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) [Li et al., 2009], für eucaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) [Kouroku et al., 2007] und für glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [Colell et al., 2007] konnte der Einfluss auf die Expression Autophagie-assoziiierter Gene gezeigt werden [Mehrpour et al., 2010b]. In humanen Monozyten und myeloiden Leukämiezellen konnte zudem ein Effekt von Vitamin D3 auf die Induktion von Autophagie-Genen nachgewiesen werden. Der Mechanismus ist noch unbekannt [Wang et al., 2008; Yuk et al., 2009]. Kürzlich wurde erstmals ein Effekt von microRNAs auf die Regulation der Autophagie gezeigt. miRNA miR-30a scheint die Expression des Atg-Gens Beclin1 (Homolog von Atg6 in der Hefe) zu reprimieren [Zhu et al., 2009]. Zudem wurde berichtet, dass für p73, das zur p53 Familie gehört, ebenfalls nachgewiesen werden konnte, dass es Autophagie induzieren kann, indem es eine Reihe Autophagie-assoziiierter Gene direkt reguliert [Balaburski et al., 2010].

Um besser zu verstehen, wie Miz1 in den autophagischen Prozess eingreift, sollte untersucht werden, ob Miz1 die Expression von Atg-Genen beeinflusst. Da Miz1 die Expression vieler seiner Zielgene zusammen mit verschiedenen Partnern reguliert (siehe hierzu auch Kapitel 1.2.2 auf Seite 15), wurde zunächst die Interaktion von Miz1 mit seinem wichtigsten Partner Myc näher betrachtet.

4.3.1 Transkriptionelle Regulation von Myc durch Miz1

Miz1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zum Einen Gene transkriptionell aktiviert [Smale and Baltimore, 1989] und zum Anderen Faktoren rekrutiert, mit deren Hilfe er die Expression von Genen hemmt [Peukert et al., 1997; Staller et al., 2001]. Für die transkriptionelle Aktivierung ist die Bindung von Miz1 an Nukleophosmin (NPM) essentiell [Herkert et al., 2010; Wanzel et al., 2008]. Die Repression von Genen durch Miz1 wird über Myc, dem bedeutendsten Interaktionspartner von Miz1, vermittelt [Herold et al., 2002; Peukert et al., 1997; Seoane et al., 2002, 2001; Staller et al., 2001; Wanzel et al., 2003] (für detailliertere Informationen siehe auch Kapitel 1.2.2 auf Seite 15).

Während bekannt ist, dass Myc die transkriptionelle Funktion von Miz1 beeinflusst (siehe oben), ist ein Einfluss von Miz1 auf Myc in der Literatur nur auf Proteinebene beschrieben worden [Salghetti et al., 1999]. Für die Stabilität des Proteins Myc ist die Assoziation von Myc mit Miz1 wichtig. In Mutanten von Myc, die nicht zu einer Bindung mit Miz1 und Max fähig waren, konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit des Proteins Myc deutlich verringert war. Wurde lediglich die Bindung mit Max unterbunden, war die Stabilität von Myc nicht beeinträchtigt. Darüberhinaus konnte bei Überexpression von Miz1 eine erhöhte Stabilität von Myc nachgewiesen werden, allerdings nur, wenn die Assoziation von Myc und Miz1 gewährleistet war. Dies bedeutet, dass Miz1 Myc stabilisiert, indem es über seine POZ-Domäne an Myc bindet [Salghetti et al., 1999].

Es wäre möglich, dass Miz1 nicht nur auf Proteinebene die Stabilität von Myc fördert, sondern auch die Genexpression von Myc reguliert. Um zu untersuchen, ob Miz1 einen Einfluss auf die Expression von Myc hat, wurde die Genexpression von Myc in MEFs mit und ohne funktionstüchtigem Miz1 analysiert. Hierzu wurden Wildtyp MEFs verglichen mit MEFs, in denen die POZ-Domäne des Miz1 Proteins ausgeknockt war (Δ POZ MEFs).

In dieser Arbeit konnte während basaler Autophagie in Δ POZ MEFs^{ARF} eine verminderte Expression von Myc im Vergleich zu Wildtypzellen gemessen werden (Abbildung 3.14 auf Seite 69). Das bedeutet, dass in Zellen, die kein funktionstüchtiges Miz1 enthielten, Myc schwächer exprimiert wurde als in Zellen mit intaktem Miz1. Ob es sich hierbei um eine direkte Wirkung von Miz1 auf die Genexpression von Myc handelt, oder ob der Effekt indirekt über ein anderes Myc-regulierendes Protein bzw. Transkriptionsfaktor vermittelt wird, kann anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten nicht beurteilt werden.

Die Daten der Genexpressionsmessungen, die in nach dem 3T3-Protokoll immortalisierten MEFs gewonnen wurden, ließen bei Berücksichtigung der gewählten Einteilungskriterien keine eindeutige Zuordnung von Myc als ein Miz1-abhängig exprimiertes Gen zu (Abbildung 3.4 auf Seite 60). Gerade in der zweiten Messwiederholung zeigte sich aber auch in Δ POZ-Knockout Zellen der 3T3 MEFs eine deutliche Repression der Genexpression im Vergleich zu Wildtypzellen. Möglicherweise könnte auch in diesem Zelltyp bei Erhöhung der Anzahl an Messwiederholungen eine Miz1-abhängige Expression von Myc nachgewiesen werden.

Die Inkubation mit EBSS bewirkte in Zellen, die intaktes Miz1 enthielten, eine Repression der Genexpression von Myc (Wildtyp MEFs^{ARF} siehe Abbildung 3.18 auf Seite 73 und mit hMiz1 substituierten Δ POZ MEFs^{ARF} siehe Abbildung 3.28 auf Seite 85). Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Expression von Myc während stimulierter Autophagie reprimiert wird. Dies könnte im Zusammenhang mit der proliferationsfördernden Wirkung von Myc und seiner Funktion bei der Überwindung des Zellzyklusarrests [Adhikary und Eilers, 2005; Wanzel et al., 2003] gesehen werden (siehe auch Kapitel 1.2.2 auf Seite 15). Die Induktion von Autophagie nach AS-Entzug ist ein Mechanismus der Zelle um das Überleben in Hungerzeiten zu sichern [Lum et al., 2005; Ryan, 2010] (siehe auch Kapitel 1.1.1 auf Seite 1). Auch eine Repression der Genexpression von Myc kann diesem Ziel dienen, da durch eine eingeschränkte Expression von Myc dessen proliferationsfördernde Wirkung auf Zellen abgeschwächt wird.

Die Ergebnisse der Genexpressionsmessungen, die in Zellen ohne funktionstüchtigem Miz1 bei Inkubation mit EBSS gewonnen wurden, sind nicht eindeutig. Während die Inkubation mit EBSS

in Δ POZ MEFs^{ARF} einen Anstieg der Genexpression bewirkte (Abbildung 3.18 auf Seite 73), führte sie in mit dem Leervektor infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} zu einer Repression der Genexpression (Abbildung 3.28 auf Seite 85). Obwohl die Ergebnisse nicht eindeutig sind, ist dennoch eine Tendenz zu erkennen, dass die Expression von Myc in MEFs^{ARF} mit funktionstüchtigem Miz1 durch die Inkubation mit EBSS stärker reprimiert wird als in MEFs^{ARF} ohne funktionstüchtigem Miz1. Das heisst, Miz1 reguliert möglicherweise auch während stimulierter Autophagie die Expression von Myc.

Zusammenfassend lassen sich die gewonnenen Ergebnisse so interpretieren, dass Miz1 die Expression von Myc während basaler Autophagie positiv reguliert und während stimulierter Autophagie reprimiert. Das würde bedeuten, dass Miz1 als Antwort auf ein Stresssignal wie AS-Entzug zum Einen fördernd auf die Autophagie wirkt, z. B. indem es die Expression Autophagie-assoziiierter Gene induziert (siehe folgendes Kapitel) und zum Anderen zu einer Hemmung der Zellproliferation beiträgt, indem es die Expression von Myc reprimiert.

Auffällig ist, dass die besprochenen Abhängigkeiten der Myc Genexpression von Miz1 nur in MEFs^{ARF} nicht aber in 3T3 MEFs nachgewiesen werden konnten. Näheres zu diesen Unterschieden folgt in Kapitel 4.3.4 auf Seite 120.

4.3.2 Einfluss von Miz1 auf die Teilschritte des autophagischen Prozesses

Um den Einfluss von Miz1 auf die Expression Autophagie-assoziiierter Gene zu untersuchen, wurde deren Genexpression in Zellen mit bzw. ohne Miz1 unter DMEM-Bedingungen verglichen. Desweiteren sollte untersucht werden, ob Miz1 die Regulation der Autophagie auch unter stimulierten Autophagie-Bedingungen beeinflusst. Ein starker Stimulus für die Autophagie ist der Entzug von Aminosäuren [Kuma et al., 2004; Liao et al., 2008; Müller, 2008]. Um einen möglichen Einfluss von Miz1 auf die Induktion der Autophagie durch die Inkubation mit EBSS zu beleuchten, wurde die Genexpression der mit EBSS inkubierten Zellen in Relation gesetzt zu den mit DMEM inkubierten Vergleichszellen. Auf diese Weise kann die Expression eines Gens während basaler Autophagie mit der nach Autophagiestimulation verglichen werden. Indem die durch EBSS bewirkte Expressionsänderung in Zellen mit bzw. ohne Miz1 verglichen wurde, konnte außerdem eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Induktion bzw. Repression abhängig von Miz1 verläuft.

Die Genexpressionsanalyse der am autophagischen Kompartiment beteiligten Gene gibt Hinweise darauf, welche Schritte des autophagischen Prozesses durch Miz1 reguliert werden könnten.

4.3.2.1 Einfluss auf die Initiation der Autophagosomenbildung

Auf die Initiation der Autophagosomenbildung konnte auf molekularer Ebene in dieser Arbeit kein Einfluss von Miz1 festgestellt werden. Die Gene ULK1 und ULK2, die maßgeblich an der Initiation beteiligt sind (siehe Kapitel 1.1.3 auf Seite 3), wurden in Δ POZ Zellen in ähnlicher Höhe exprimiert wie in Wildtypzellen (Abb. 3.3, 3.12, 3.13). Auch in Δ POZ Zellen, die lediglich das trunkierte Miz1 aufwiesen, war die Genexpression der beiden Gene vergleichbar mit der in den mit hMiz1 substituierten Zellen (Abb. 3.22, 3.25). Die Inkubation mit EBSS bewirkte eine Induktion der Genexpression, die jedoch unabhängig von Miz1 war (Abb. 3.9, 3.10, 3.16, 3.17, 3.23, 3.27).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Gene ULK1 und ULK2 während basaler Autophagie unabhängig von Miz1 exprimiert werden und dass ihre Expression nach Inkubation mit EBSS unabhängig von Miz1 induziert wird.

4.3.2.2 Einfluss auf die Reifung von Autophagosomen

Für die Elongation der Phagophorenmembran spielen vor allem die Gene des Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystems eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 1.1.3 auf Seite 3). In dieser Arbeit konnten Hinweise gefunden werden, dass die Expression einiger dieser Gene durch Miz1 reguliert werden. Dies ist als Hinweis zu werten, dass Miz1 an der Ausbildung autophagischer Vesikel und an der Autophagosomenreifung beteiligt ist. Zusätzlich konnte das Gen Atg9, für das ebenfalls eine Funktion in der Membranelongation bekannt ist (Kapitel 1.1.3 auf Seite 3), als Miz1-abhängig identifiziert werden. Auf Atg9 wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

Atg4

In höheren Eukaryoten sind vier Paraloge von Atg4 bekannt, Atg4a, b, c und d [Mariño et al., 2003]. Atg4 agiert als Cystein-Protease, indem sie das C-terminale Arginin von LC3 absplattet und damit zu LC3-I umwandelt. LC3-I kann an Phosphatidylethanolamin (PE) binden und wird in dieser Form als LC3-II bezeichnet. Nach Schluß des Autophagosoms spaltet Atg4 gebundenes LC3-II von PE ab, das nun wieder in löslicher Form als LC3-I im Zytosol zur Verfügung steht [Kabeya et al., 2000; Kirisako et al., 2000]. Auf diese Weise spielt Atg4 eine wichtige Rolle für die Prozessierung von LC3 und für die Dekonjugation von an PE gebundenem LC3-II (siehe auch Kapitel 1.1.3 auf Seite 3). Atg4b scheint das in Säugerzellen bedeutendste der vier Paraloga zu sein. Es fördert die Prozessierung der bekannten Säugerparaloga von LC3, GABARAP, GATE-16 und Apg8L, und es konnte gezeigt werden, dass Atg4b die Fähigkeit besitzt, LC3 zu delipidieren [Hemelaar et al., 2003; Tanida et al., 2004]. Für andere Atg4 Paraloga konnte eine Funktion bei der Konjugation von LC3 nicht nachgewiesen werden. Man geht aber davon aus, dass sie spezifisch auf bestimmte Paraloga von LC3 wirken könnten. Atg4a zum Beispiel wirkt als Cystein Protease auf das LC3 Paralog GATE-16 [Betin and Lane, 2009b; Scherz-Shouval et al., 2007]. Experimente an Atg4c-Knockout Mäusen zeigten, dass Atg4c unter normalen Bedingungen nicht für den Autophagieprozess essentiell ist. Allerdings erfordert die Anpassung des Organismus an Stressbedingungen, wie z. B. Hunger, Atg4c für eine effektive autophagische Antwort [Mariño et al., 2007]. Atg4d ist seinerseits Ziel für Prozessierungen und übt eine wichtige Funktion für die Regulation von Autophagie und Apoptose aus [Betin and Lane, 2009a,b].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gene Atg4c und Atg4d in 3T3 MEFs während basaler Autophagie abhängig von Miz1 exprimiert werden. In Δ POZ Zellen war die Expression der beiden Gene im Vergleich zu Wildtypzellen erniedrigt (Abbildung 3.5 auf Seite 61). Die Ergebnisse für Atg4c konnten in einer Diplomarbeit bestätigt werden [Oppenheimer, 2009]. Für Atg4a konnte in Δ POZ MEFs^{ARF}, die lediglich das trunkierte Miz1 aufwiesen, eine verminderte Expression im Vergleich zu den mit hMiz1 substituierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.26 auf Seite 83). Inwieweit die Genexpression des einen oder anderen Atg4-Paralogs durch Miz1 reguliert wird, ist anhand der vorliegenden Daten nicht mit abschließender Sicherheit zu beurteilen, da die

gefundenen Effekte nur jeweils in einer Zelllinie nachzuweisen waren. Für Atg4b, dem Paralog, dem in der Autophagie die wichtigste Bedeutung zugeschrieben wird (siehe oben), konnte keine Abhängigkeit von Miz1 während basaler Autophagie gezeigt werden. Dennoch geben die Daten einen starken Hinweis dafür, dass Miz1 grundsätzlich an der Regulation der Genexpression von Atg4 beteiligt sein könnte. Ob diese Regulation auf direktem oder indirektem Weg erfolgt und wie sich der Einfluss von Miz1 auf die verschiedenen Paraloga unterscheidet, muss in weitergehenden Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Die Inkubation mit EBSS bewirkte in mit dem Leervektor infizierten Δ POZ MEFs^{ARF} eine stärkere Induktion der Genexpression von Atg4a und Atg4b als in den mit pB-Miz1 infizierten Vergleichszellen (Abbildung 3.28 auf Seite 85). Untersuchungen in mit dem pBABE Vektor infizierten Δ POZ 3T3 MEFs ergaben für Atg4b jedoch hierzu widersprüchliche Ergebnisse (Abbildung 3.24 auf Seite 81). Für die anderen Atg4-Paraloga sowie in den Untersuchungen in nicht-infizierten Zellen konnten keine Abhängigkeiten von Miz1 festgestellt werden. Der Einfluss von Miz1 auf die Regulation der Genexpression der Atg4-Paraloga nach Inkubation mit EBSS bleibt somit unklar.

Atg16 und Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme

Neben Atg16 sind Atg12, Atg5, Atg7, Atg10, Atg3 und LC3 wichtige Gene des Konjugationssystems und sollen im Folgenden behandelt werden. Atg12 und Atg5 sind Teile eines Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystems, die mit Atg16 einen stabilen Komplex bilden und eine wichtige Funktion für die Elongation der Phagophorenmembran und die Ausbildung der Autophagosomen übernehmen [Kuma et al., 2002; Mizushima et al., 1999] (siehe auch Kapitel 1.1.3 auf Seite 3). Mizushima und Kollegen konnten 2003 das Säugetierhomolog des Hefe-Proteins Atg16 identifizieren [Mizushima et al., 2003]. In der Maus wird es in drei Isoformen exprimiert, für die jedoch keine Unterschiede bezüglich ihrer Fähigkeit, eine Komplexbildung mit Atg12 und Atg5 einzugehen, festgestellt werden konnten. Es besteht aber die Möglichkeit, dass sich die Atg16 Isoformen in weiteren, noch nicht untersuchten Funktionen unterscheiden [Mizushima et al., 2003]. Atg7 fungiert als Vermittler in den beiden Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystemen (siehe auch Kapitel 1.1.3 auf Seite 3). Es unterstützt die Konjugation von Atg12 an Atg5 sowie die Lipidierung von LC3-I zu LC3-II [Yang and Klionsky, 2009].

In Δ POZ MEFs^{ARF}, die mit dem Leervektor infiziert wurden, war die Genexpression der an der Elongation der Phagophorenmembran beteiligten Gene Atg3, Atg5, Atg7, LC3b und Atg10 vermindert im Vergleich zu den Zellen, die das humane Miz1 überexprimierten (Abbildung 3.26 auf Seite 83). Dies spricht für eine Abhängigkeit der Expression dieser Gene von Miz1. In einer nachfolgenden Diplomarbeit wurde die Abhängigkeit der Gene Atg5 und Atg7 von Miz1 bestätigt [Oppenheimer, 2009]. Die Messungen im Rahmen dieser Diplomarbeit zeigten eine statistisch signifikant verminderte Genexpression von Atg5 und Atg7 in Δ POZ 3T3 MEFs im Vergleich zu Wildtyp 3T3 MEFs. Da die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen in mit dem pBABE Vektor substituierten Δ POZ MEFs^{ARF} nur einmal durchgeführt wurden und die Ergebnisse für die oben genannten Gene in anderen Zelltypen nicht bestätigt werden konnten, kann jedoch keine definitive Aussage zur Miz1-Abhängigkeit dieser Gene getroffen werden.

Während stimulierter Autophagie wurden die oben genannten Gene in mit dem pBABE Vektor substituierten Δ POZ MEFs^{ARF} ebenfalls abhängig von Miz1 exprimiert. In den mit dem Leervektor infizierten MEFs wurde die Expression dieser Gene stärker durch EBSS induziert als in den mit hMiz1 substituierten MEFs (Abbildung 3.28 auf Seite 85). Auch hier ist die Datenlage jedoch unsicher, da die Daten auf nur einer Messwiederholung beruhen und die Ergebnisse in den verschiedenen Zelltypen zum Teil gegensätzlich waren. Hier wären weitere Messwiederholungen nötig, um den Einfluss von Miz1 auf das Verhalten der Transkription dieser Gene bei Inkubation mit EBSS aufzuklären.

Für Atg16L2 war die Datenlage eindeutiger. Bei Inkubation mit Vollmedium wurde Atg16L2 in Δ POZ 3T3 MEFs und Δ POZ MEFs^{ARF} stärker exprimiert als in den jeweiligen Wildtypzellen (Abbildung 3.5 auf Seite 61 und Abbildung 3.14 auf Seite 69). Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die Expression von Atg16L2 während basaler Autophagie durch Miz1 reguliert wird. Diese Ergebnisse werden zudem durch andere in der Arbeitsgruppe durchgeführte Messungen mittels semiquantitativer PCR gestützt [Müller, 2008]. Die Daten lassen vermuten, dass Miz1 dafür verantwortlich ist, die Expression von Atg16L2 während basaler Autophagie zu drosseln. Eine andere Erklärung wäre, dass die vermehrte Expression von Atg16L2 in Δ POZ MEFs ein Anpassungsmechanismus an den Ausfall der POZ-Domäne ist. Demnach würde als Ausgleich dafür, dass ein anderes Gen durch den Miz1 POZ-Domäne Knockout vermindert exprimiert wird, indirekt die Genexpression von Atg16L2 induziert werden.

Die Inkubation mit EBSS bewirkte eine Induktion der Atg16L2 Expression, allerdings konnte ein Einfluss von Miz1 auf die Induktion nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Regulation der Atg16L2 Expression während stimulierter Autophagie unabhängig von Miz1 verläuft.

In der Literatur sind bislang keine unterschiedlichen Funktionen für die Atg16 Isoformen beschrieben. Dennoch konnten in dieser Arbeit Unterschiede der Genexpressionen von Atg16L1 und Atg16L2 festgestellt werden. Es ist somit möglich, dass den beiden Proteinen bisher noch unbekannte Funktionen zukommen.

4.3.2.3 Einfluss auf den Membrantransport

In Säugerzellen sind zwei Homologe des zunächst in der Hefe beschriebenen Transmembranproteins Atg9 bekannt. Das heute als Atg9a bezeichnete Homolog wird ubiquitär in Säugerzellen exprimiert, während Atg9b vor allem in der Plazenta und in der Hypophyse nachgewiesen werden konnte [Yamada et al., 2005]. Bislang wird in der Literatur in Bezug auf die Funktion meist nicht zwischen den beiden Formen unterschieden.

Wie in Kapitel 1.1.3 auf Seite 3 beschrieben, wird Atg9 eine wichtige Aufgabe bei der Autophagosomenbildung zugeschrieben. Indem es Lipide und Proteine an die sich verlängernde autophagosomale Membran rekrutiert, trägt es zur Membranverlängerung bei und ermöglicht die Sequestrierung zytoplasmatischen Materials [Webber et al., 2007]. Ein Protein, das mit Atg9 zu interagieren scheint, ist Bif-1. Es wird vermutet, dass die Verschmelzung von Bif-1-haltigen Vesikeln mit Strukturen, die Atg9 enthalten, die nötigen Voraussetzungen für die Krümmung der wachsenden

Autophagosomenmembran schaffen [Takahashi et al., 2008]. Zudem scheint Bif-1 bei geringem Nährstoffangebot die Abspaltung von Membranen des Golgi-Apparates zu vermitteln und auf diese Weise die Bereitstellung Atg9-haltiger Membranen für die Autophagosomenbildung zu regeln [Takahashi et al., 2011]. Kürzlich konnte außerdem p38 interacting protein (p38IP) als neuer Interaktionspartner von Atg9 identifiziert werden. Es bindet an die C-terminale Domäne von Atg9 und übernimmt eine wichtige Funktion bei der Umverteilung von Atg9 unter Hungerbedingungen und damit für Autophagosomenbildung und Regulation des autophagischen Prozesses. Dies scheint der erste Hinweis für die Regulation des autophagischen Prozesses durch das Protein Atg9 zu sein. Eine Aktivierung von p38 α mitogen-activated protein kinase (MAPK), einer Kinase die die Interaktion von p38IP und Atg9 negativ reguliert, kann das Niveau an Autophagie über Atg9 und p38IP kontrollieren. Dies dient wahrscheinlich dazu, das Ausmaß der Autophagie zu begrenzen und könnte ein Mechanismus sein, autophagischen Zelltod zu limitieren [Webber and Tooze, 2010a].

Unter basalen Bedingungen konnte ein Einfluss von Miz1 auf die Atg9b Expression gezeigt werden. In Δ POZ MEFs^{ARF} wurde Atg9b im Vergleich zu Wildtypzellen weniger stark exprimiert. Die Daten zweier Experimente sowie eines technischen Replikats waren konsistent und deuteten auf eine Miz1-abhängige Expression hin (Abbildung 3.14 auf Seite 69). In 3T3 MEFs zeigte die Expression von Atg9b in Δ POZ Zellen ebenfalls sehr große Abweichungen von der Expression in Wildtypzellen. Da das Gen jedoch in einer Messung stärker und in der anderen schwächer als in Wildtypzellen exprimiert wurde, konnte für diesen Zelltyp anhand der vorliegenden Daten keine eindeutige Aussage getroffen werden (Abbildung 3.4 auf Seite 60). Interessant ist, dass in einer nachfolgenden Diplomarbeit von Sarah Oppenheimer herausgefunden wurde, dass Atg9b in Δ POZ 3T3 MEFs signifikant reprimiert ist [Oppenheimer, 2009]. Auch in ihrer Messreihe war jedoch ein einzelner Messwert zu verzeichnen, der einen bis zu 3-fachen Anstieg der Atg9b Expression in Δ POZ MEFs aufwies. Es könnte somit durchaus sein, dass der in dieser Arbeit gemessene Wert der zweiten Messung in Δ POZ 3T3 MEFs, der einen 2,2fachen Anstieg anzeigte (Abbildung 3.4 auf Seite 60), auf einem technischen Fehler beruht, der durch Pipettierungsungenauigkeiten, einer fehlerhaften cDNA-Synthese oder Ähnlichem zustande gekommen sein könnte. Das heißt, es wäre möglich, dass das Gen Atg9b in 3T3 MEFs abhängig von Miz1 exprimiert wurde. Unterstützt wird diese Hypothese von anderen in der Arbeitsgruppe durchgeführten Messungen mittels semiquantitativer PCR, die ebenfalls eine Repression von Atg9b in Δ POZ 3T3 MEFs zeigten [Müller, 2008].

Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, dass Miz1 während normaler, basaler Autophagie an der Regulation der Expression von Atg9b beteiligt ist. Untermauert wird dieses Ergebnis zusätzlich durch Ergebnisse des Substitutionsexperiments in Δ POZ MEFs^{ARF}. Bei Inkubation mit Vollmedium konnte in den hMiz1 überexprimierenden Zellen eine stärkere Genexpression von Atg9b als in den mit dem Leervektor infizierten Vergleichszellen beobachtet werden (Abbildung 3.26 auf Seite 83). Dies zeigt, dass die Substitution von humanem Miz1 die Expression von Atg9b in Δ POZ Zellen verändert. Außerdem kann daraus gefolgert werden, dass das substituierte humane Miz1 die Expression von Atg9b in Δ POZ Zellen wiederherzustellen vermag. Dies lässt auf einen rettenden Effekt der Miz1-Substitution auf die Atg9b Expression schließen. Gestützt werden diese Ergebnisse durch ein Substitutionsexperiment von hMiz1 in 3T3 MEFs, das mit Hilfe semiquantitativer PCR-Messungen ausgewertet wurde [Müller, 2008]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass

die Ergebnisse insgesamt einen sehr starken Hinweis dafür liefern, dass Miz1 für die Expression von Atg9b während basaler Autophagie eine entscheidende Rolle spielt. Es kann daher vermutet werden, dass Miz1 nicht nur über die Transkriptionsregulation der am Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystem beteiligten Gene die Reifung von Autophagosomen regulieren kann, sondern dass es auch durch die Regulation der Expression von Atg9b Einfluss auf Prozesse der Membranelongation, der Membrankrümmung und Autophagosomenbildung nimmt. Es ist bekannt, dass Atg9b an der Verteilung autophagischer Membranen beteiligt ist [Webber and Tooze, 2010a]. Es ist zu vermuten, dass Miz1 durch die Transkriptionsregulation von Atg9b diese Verteilung beeinflussen kann.

Nach Induktion der Autophagie konnte eine Abhängigkeit der Atg9b Genexpression von Miz1 in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Die Inkubation mit EBSS bewirkte sowohl in 3T3 MEFs als auch in MEFs^{ARF} eine Induktion der Atg9b Expression. Aufgrund uneinheitlicher Messergebnisse konnte jedoch nicht differenziert werden, ob diese Induktion abhängig von Miz1 verlief (Abbildung 3.10 auf Seite 66 und Abbildung 3.17 auf Seite 72). Während ein Einfluss von Miz1 auf die Genexpression von Atg9b während basaler Autophagie sehr wahrscheinlich ist, bleibt die Rolle von Miz1 auf die Regulation nach Induktion der Autophagie unklar. Da Atg9b unter Bedingungen einer stimulierten Autophagie auch in Δ POZ Zellen induziert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Expression von Atg9b nicht nur von Miz1, sondern auch von anderen Faktoren reguliert wird. Es wäre auch denkbar, dass der Einfluss, den Miz1 auf die Expression von Atg9b unter basalen Bedingungen ausübt, während stimulierter Autophagie an Bedeutung verliert. Die Stimulation mit EBSS bewirkt eine Induktion von Signalkaskaden, die Autophagie positiv regulieren [Blommaert et al., 1995; Ravikumar et al., 2010; Sarbassov et al., 2005; Wang and Levine, 2010] (siehe auch Kapitel 1.1.5 auf Seite 8). Es wäre möglich, dass diese zusätzlich aktivierten Signalkaskaden die Expression von Atg9b so stark induzieren können, dass in Δ POZ Zellen, denen die fördernde Wirkung von Miz1 fehlt, dieser Mangel zumindest teilweise überwunden werden kann.

Es ist bislang nicht bekannt, in wie fern und ob sich die Funktionen von Atg9a und Atg9b unterscheiden und ob die Proteine austauschbar verwendet werden können. In den hier durchgeführten Genexpressionsmessungen konnte ein klarer Unterschied der Genexpressionen von Atg9a und Atg9b festgestellt werden, was eine unterschiedliche Funktion der beiden Gene in der Autophagie vermuten lassen könnte. Es müsste jedoch geklärt werden, ob sich dieser Unterschied auch auf Proteinebene manifestiert.

In dieser Arbeit konnte ein Einfluss des Transkriptionsfaktors Miz1 auf die Expression der Autophagie-assoziierten Gene Atg9b und Atg16L2 festgestellt werden. Für weitere Atg-Gene kann ein Einfluss vermutet, in dieser Arbeit jedoch nicht sicher gezeigt werden. Um weitere Informationen über die Art des Einflusses von Miz1 zu erhalten, wäre es interessant zu untersuchen, ob Miz1 die beiden Gene direkt oder indirekt reguliert. Hierfür könnte ein ChIP Assay durchgeführt werden, mit dessen Hilfe es möglich wäre, zu bestimmen, ob eine Bindung des Proteins Miz1 an das Gen Atg9b bzw. Atg16L2 erfolgt. Außerdem könnte in weiterführenden Experimenten überprüft werden, ob sich die Veränderungen, die auf Genexpressionsebene beobachtet werden konnten, auch auf die Proteinsynthese der Zellen auswirken. Hierfür könnten Westernblots durchgeführt werden, in denen

mit Hilfe spezifischer Antikörper Atg-Proteine identifiziert werden könnten. In einer nachfolgenden Diplomarbeit [Oppenheimer, 2009] wurde dies bereits für die Atg-Proteine Atg4c, Atg5, Atg7 und Atg9b versucht. Leider konnte für keines der Proteine ein Ergebnis erzielt werden.

4.3.3 Konventionelle Makroautophagie vs. Atg5/Atg7-unabhängige, alternative Makroautophagie

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Schritte der Autophagie werden allgemein als konventionelle Makroautophagie bezeichnet. Vor Kurzem wurde allerdings eine alternative Form von Makroautophagie beschrieben [Nishida et al., 2009], die ebenfalls zur Autophagosomenbildung und zum autophagischen Abbau von Proteinen führt, bei der jedoch charakteristische und als essentiell angesehene Details (z.B. Mitwirken von Atg5 und Atg7, Bildung von LC3-II) fehlen (für eine detaillierte Beschreibung des Prozesses siehe Kapitel 1.1.4 auf Seite 7).

In dieser Arbeit kann nicht sicher differenziert werden, welche Form der Autophagie in den untersuchten MEFs durch Aminosäureentzug induziert wurde. Die Ergebnisse der Genexpressionsmessungen lassen keine eindeutige Zuordnung zu den beiden in der Literatur beschriebenen Varianten der Autophagie zu. Die Induktion der Genexpression der Gene Atg7, LC3a, LC3b, Atg9a, Atg9b, Atg10, Atg12, Atg16L1 und Atg16L2 durch AS-Entzug, die in allen untersuchten Zelltypen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.9, 3.10, 3.16, 3.17, 3.23, 3.24, 3.27, 3.28), ist auf eine Induktion konventioneller Autophagie zurückzuführen, wenn man die Aussage von Nishida und Kollegen berücksichtigt, dass die Gene der Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme, darunter Atg5, Atg7, LC3, Atg12 und Atg16 sowie das Gen Atg9 nicht an alternativer Autophagie beteiligt sind [Nishida et al., 2009] (siehe auch Kapitel 1.1.4 auf Seite 7). Die Expression von Atg3 und Atg5 wurde in Wildtyp und Δ POZ MEFs durch EBSS jedoch nicht induziert oder die Daten waren widersprüchlich (Abb. 3.6, 3.7, 3.15). Es ist durchaus möglich, dass diese beiden Gene, die eine wichtige Rolle in den Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystemen spielen (siehe Kapitel 1.1.3 auf Seite 3), unabhängig vom verwendeten Medium exprimiert werden. Für die Stimulation des autophagischen Prozesses durch AS-Entzug ist es nicht notwendigerweise erforderlich, dass alle Atg-Gene induziert werden. Theoretisch wäre es allerdings auch denkbar, dass die fehlende Induktion von Atg5 auf eine Induktion alternativer Makroautophagie zurückzuführen sein könnte. Ein weiterer Hinweis dafür, dass zusätzlich alternative Autophagie in den untersuchten MEFs induziert worden sein könnte, ist die EBSS-abhängige Induktion der Genexpression von ULK1 in allen untersuchten Zelltypen (Abb. 3.10, 3.17, 3.23, 3.27), da ULK1 maßgeblich an der Regulation alternativer Autophagie beteiligt sein soll [Nishida et al., 2009]. Selbstverständlich können die Genexpressionen von ULK1 und ULK2 aber auch im Rahmen konventioneller Autophagie nach EBSS Inkubation induziert worden sein. Da die Auslöser, die den einen oder anderen Weg der Autophagie induzieren, bislang nicht bekannt sind und zudem noch Unklarheit darüber herrscht, welche der für die konventionelle Autophagie wichtigen Gene an alternativer Autophagie beteiligt sind, kann somit nicht unterschieden werden, welche Form der Autophagie in den MEFs der durchgeführten Experimente induziert wurde. Interessant wäre, in weiterführenden Versuchen das Expressionsmuster von Rab9 zu quantifizieren, da der GTPase Rab9 eine wichtige Rolle für die Membranelongation und für Fu-

sionsprozesse während Atg5-unabhängiger Autophagie zugeschrieben wird [Nishida et al., 2009]. Es wird spekuliert, dass die Funktionen von Atg5 während alternativer Makroautophagie durch Rab9 ersetzt werden [Shimizu et al., 2010]. Hinsichtlich dieser neuen Erkenntnisse im Bereich der Autophagieforschung ergibt sich eine neue Dimension der Frage des Einflusses von Miz1 auf die Autophagie. Um den Einfluss von Miz1 auf den einen oder anderen Weg der Autophagie näher differenzieren zu können, wäre es nötig, die molekularen Mechanismen der alternativen Autophagie weiter aufzuklären. Es wäre gut möglich, dass Miz1 in der Regulation der beiden Prozesse unterschiedliche Funktionen übernimmt. Bislang handelt es sich bei alternativer Autophagie um eine neue Entdeckung, über deren Bedeutung und Stellenwert noch keine einheitliche Meinung herrscht [Klionsky and Lane, 2010]. So wurde die Frage aufgeworfen, ob dieser Mechanismus überhaupt als Autophagie bezeichnet werden kann, da üblicherweise mit dem Begriff Makroautophagie ein Prozess bezeichnet wird, der neben morphologisch fassbaren Veränderungen auch eine Beteiligung der Atg-Proteine, und zwar insbesondere des LC3, einschließt. Da der von Nishida und Kollegen aufgedeckte und mit alternativer Autophagie bezeichnete Mechanismus diese Kriterien nicht erfüllt, wurde angeregt, eine neue unabhängige Bezeichnung für den Vorgang zu schaffen [Klionsky and Lane, 2010].

4.3.4 Einfluss von ARF auf die Regulation der Genexpression durch Miz1

Bei der Interpretation der Ergebnisse aus den Genexpressionsmessungen wurde bislang nicht unterschieden, ob es sich um in 3T3 MEFs oder in MEFs^{ARF} gewonnene Erkenntnisse handelte. Während für die Immortalisierung von 3T3 MEFs die Akquirierung von Mutationen Voraussetzung ist, erfolgte die Immortalisierung bei MEFs^{ARF} durch shRNA vermittelten knockdown von ARF (siehe Kapitel 2.1.6 auf Seite 25). Betrachtet man die Ergebnisse aus 3T3 MEFs und MEFs^{ARF}, fällt jedoch auf, dass zum Teil deutliche Unterschiede in den Ergebnissen zwischen Zellen, die ARF exprimieren (3T3 MEFs) und solchen in denen ARF ausgeknockt wurde (MEFs^{ARF}) bestehen.

Bei der Genexpressionanalyse von Miz1 in 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} wurde deutlich, dass Miz1 unter DMEM-Bedingungen in Δ POZ-Knockout Zellen bei Fehlen von ARF anders exprimiert wurde als bei Vorhandensein von ARF. In Zellen, in denen lediglich die Miz1 POZ-Domäne ausgenockt war (Δ POZ 3T3 MEFs), wurde Miz1 stärker exprimiert als in Wildtypzellen mit intaktem Miz1 (Wt 3T3 MEFs) (Abbildung 3.2 auf Seite 58). War jedoch zusätzlich zur POZ-Domäne von Miz1 ARF ausgenockt (Δ POZ MEFs^{ARF}), wurde Miz1 in Δ POZ-Zellen deutlich schwächer exprimiert als in Zellen mit funktionstüchtigem Miz1 (Wt MEFs^{ARF}) (Abbildung 3.11 auf Seite 67). Das heißt, Miz1 wurde in Δ POZ Zellen bei Fehlen von ARF dramatisch herunterreguliert. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass ARF Einfluss auf die Regulation der Miz1-Genexpression hat. Um dies näher zu untersuchen, wäre es jedoch sinnvoll, die Expression von Miz1 in Wildtyp 3T3 MEFs und in Wildtyp MEFs^{ARF} mittels qPCR-Messungen direkt zu vergleichen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Die qPCR ist eine relative Quantifizierungsmethode und erlaubt vergleichende Aussagen nur zwischen Ergebnissen, die auf die gleiche Bezugsgröße normalisiert wurden. Der Versuchsaufbau wurde so gewählt, dass die Messungen in 3T3 MEFs auf die Wildtyp 3T3 MEFs unter DMEM-Bedingungen und die Messungen in MEFs^{ARF} auf

die Wildtyp MEFs^{ARF} unter DMEM-Bedingungen normiert wurden. Es kann somit lediglich die Expressionsänderung in den beiden Zelltypen bei Ausschalten der POZ-Domäne im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypzellen beurteilt werden.

Außer einem Einfluss von ARF auf die Genexpression von Miz1 kann anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten vermutet werden, dass ARF Einfluss auf die Expressionsregulation von Genen durch Miz1 nimmt. Nur in MEFs^{ARF} konnte eine Abhängigkeit der Myc Genexpression von Miz1 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse konnten in MEFs, die ARF unverändert exprimierten (3T3 MEFs) nicht gezeigt werden (siehe hierfür auch Kapitel 4.3.1 auf Seite 111). Das heißt, es wäre möglich, dass ARF an der Regulation der Myc Genexpression durch Miz1 beteiligt ist.

Es ist bekannt, dass ARF das Spektrum an Genen, die durch Miz1 reprimiert werden, erweitert [Herkert et al., 2010]. Während Miz1 allein die Genexpression von mindestens 100 verschiedenen Zielgenen reprimiert, führen ARF und Miz1 zusammen zur Repression von 322 Zielgenen [Herkert et al., 2010]. Auf ähnliche Weise erweitert sich in Anwesenheit von ARF die Anzahl der durch Myc reprimierten Gene. Es gibt Überlappungen der durch Miz1 mit ARF und der durch Myc mit ARF reprimierten Zielgene. Einige der durch Miz1 in Anwesenheit von ARF reprimierten Gene werden jedoch nicht durch Myc reguliert [Herkert et al., 2010]. Dies ist ein Hinweis dafür, dass ARF zusammen mit Miz1 die Genexpression bestimmter Gene regulieren kann. Theoretisch wäre es denkbar, dass es sich bei einem dieser von Miz1 und ARF reprimierten Gene um Myc handelt. Ein weiterer Hinweis dafür, dass ARF Einfluss auf die Miz1-vermittelte Regulation der Genexpression nehmen kann, ist die Tatsache, dass ARF an Miz1 binden und dabei NPM, einen Koaktivator von Miz1, der für die Miz1-Funktion essentiell ist, aus seiner Bindung mit Miz1 verdrängen kann [Herkert et al., 2010; Wanzel et al., 2008]. ARF konkurriert mit NPM um die Bindung an Miz1 und kann auf diese Weise die transkriptionelle Aktivierung der Zielgene von Miz1 verhindern [Herkert et al., 2010]. Die vorgestellten Mechanismen zeigen, dass ARF und Miz1 interagieren und gemeinsam an der Regulation der Genexpression bestimmter Gene beteiligt sind. Sie können die in dieser Arbeit angestellten Vermutungen, dass die Genexpression von Myc in Abhängigkeit von ARF durch Miz1 reguliert wird, jedoch nicht bestätigen. Da die Ergebnisse dieser Arbeit auf sehr wenigen Daten beruhen und bislang nicht reproduziert wurden, bleiben die gezogenen Schlüsse spekulativ. Es wäre jedoch interessant, den Hinweis der Interaktion von ARF und Miz1 in der Regulation der Genexpression von Myc weiter zu verfolgen.

Weitere Hinweise für den Einfluß von ARF auf die Expressionsregulation durch Miz1 finden sich bei der Genexpressionsanalyse Autophagie-assoziiierter Gene. Die Gene, die in 3T3 MEFs Miz1-abhängig exprimiert bzw. Miz1-abhängig durch EBSS reguliert wurden, unterscheiden sich von denen, die in MEFs^{ARF} als Miz1-abhängig identifiziert wurden. In Tabelle 4.1 auf Seite 122 sind die Miz1-abhängigen Gene in ARF-haltigen Zellen (3T3 MEFs) den Miz1-abhängigen Genen in Zellen ohne ARF (MEFs^{ARF}) gegenübergestellt. Insgesamt fällt auf, dass abhängig vom Vorhandensein von ARF unterschiedliche Gene als Miz1-abhängig identifiziert wurden. Außerdem ist festzustellen, dass, wenn ein Gen in beiden Zelltypen Miz1-abhängig exprimiert bzw. Miz1-abhängig durch EBSS reguliert wurde, die Art des Einflusses von Miz1 auf die Genexpression häufig gegensätzlich war (in Tabelle 4.1 auf Seite 122 gekennzeichnet durch einen grünen oder roten Pfeil). Wurde die Expression eines Gens in Zellen mit ARF bei Fehlen der POZ-Domäne verstärkt expri-

miert (gekennzeichnet durch einen grünen Pfeil), so wurde sie in Zellen ohne ARF bei Fehlen der POZ-Domäne herunterreguliert (gekennzeichnet durch einen roten Pfeil) und umgekehrt. Dies lässt einen Einfluß von ARF auf die Expressionsregulation Autophagie-assoziiierter Gene durch Miz1 vermuten.

Gen	DMEM kultiviert				EBSS kultiviert			
	Δ POZ 3T3 MEFs	Δ POZ MEFs ^{ARF}	Δ POZ 3T3 MEFs + pB- \emptyset	Δ POZ MEFs ^{ARF} + pB- \emptyset	Δ POZ 3T3 MEFs	Δ POZ MEFs ^{ARF}	Δ POZ 3T3 MEFs + pB- \emptyset	Δ POZ MEFs ^{ARF} + pB- \emptyset
ULK1	-	-	-	-	-	-	-	-
ULK2	-	-	-	-	-	-	-	-
Atg3	-	-	↑	↓	-	-	↓	↑
Atg4a	-	-	-	↓	-	-	-	↑
Atg4b	-	-	-	-	-	-	↓	↑
Atg4c	↓	-	-	-	-	-	-	↑
Atg4d	↓	-	-	-	-	-	-	-
Atg5	-	-	-	↓	-	-	-	↑
Atg7	-	-	-	↓	-	-	-	↑
LC3a	-	-	-	-	-	-	-	↑
LC3b	-	-	-	-	-	-	-	↑
Atg9a	-	-	-	-	-	-	-	↑
Atg9b	-	↓	-	↓	-	-	↓	↑
Atg10	-	-	-	↓	-	-	↓	↑
Atg12	-	-	-	-	-	-	-	↑
Atg16L1	-	-	-	-	-	-	↓	-
Atg16L2	↑	↑	-	-	-	-	-	-
Myc	-	↓	-	-	-	↑	-	↑

Tabelle 4.1: Übersicht über die Miz1-abhängigen Gene unter DMEM Bedingungen sowie über die bei Inkubation mit EBSS Miz1-abhängig regulierten Gene. Es sind jeweils die Genexpressionen der Zellen ohne Miz1 auf die Genexpressionen der Zellen mit Miz1 bezogen. Mit ↑ sind die Gene gekennzeichnet, die bei Inkubation mit DMEM in Zellen ohne Miz1 (Δ POZ MEFs oder Δ POZ pB- \emptyset) im Vergleich zu Zellen mit Miz1 (Wildtyp MEFs oder Δ POZ pB-Miz1) verstärkt exprimiert werden. Mit ↓ sind die Gene versehen, die bei Inkubation mit DMEM in Zellen ohne Miz1 im Vergleich zu Zellen mit Miz1 vermindert exprimiert werden. Der Pfeil ↑ kennzeichnet Gene, die nach Inkubation mit EBSS in MEFs ohne Miz1 (Δ POZ MEFs oder Δ POZ pB- \emptyset) stärker induziert oder weniger stark reprimiert wurden als in MEFs mit Miz1 (Wildtyp MEFs oder Δ POZ pB-Miz1). Gene, bei denen die Inkubation mit EBSS in MEFs ohne Miz1 eine schwächere Induktion der Genexpression bzw. eine stärkere Repression als in MEFs mit Miz1 bewirkte, sind mit ↓ versehen.

Interessant ist dies aber außerdem, da für p19^{ARF} bereits eine Funktion in der Autophagie festgestellt werden konnte [Abida and Gu, 2008]. Die oben diskutierten Unterschiede sind somit womöglich nicht nur auf den Einfluss von ARF auf die Expressionsregulation durch Miz1 zurückzuführen, sondern zusätzlich auf eine Miz1-unabhängige Wirkung von ARF auf den Prozess der Autophagie. Wie in Kapitel 1.2.3 auf Seite 18 beschrieben, ist p19^{ARF} ein Tumorsuppressor, der durch Stabilisierung von p53 eine fördernde Wirkung auf Zellzyklusarrest und Apoptose hat [Honda and Yasuda, 1999; Pomerantz et al., 1998]. Die fördernde Wirkung von p53 auf die Autophagie ist bereits seit Längerem bekannt [Levine and Abrams, 2008]. Abida und Kollegen schlugen ein Modell vor, nach

dem ARF ebenfalls Autophagie induzieren kann und zwar sowohl in einer p53-abhängigen Form, als auch in einer p53-unabhängigen Form [Abida and Gu, 2008]. Diese These konnte von Reef und Kimchi nicht bestätigt werden. Demnach scheint nukleolär lokalisiertes ARF Autophagie in einer p53-unabhängigen Form nicht induzieren zu können [Reef and Kimchi, 2008]. Es konnte aber gezeigt werden, dass Autophagie auch über eine kürzere, mitochondriale Isoform von p19^{ARF} induziert werden kann [Reef et al., 2006]. Short mitochondrial ARF (smARF) entsteht aus ARF mRNA durch Translationsbeginn an Met45 und enthält nicht die NH₂-terminale Region, die in p19^{ARF} für die Funktionen im Zellkern, die Bindung an Mdm2 und die Aktivierung von p53 benötigt wird. Überexprimiertes smARF - durch ektope Expression zellulärer oder viraler Onkogene - kann Autophagie induzieren, wobei smARF unter normalen Bedingungen aufgrund eines hohen Umsatzes in sehr geringen Konzentrationen vorliegt [Reef et al., 2006].

Der Knockdown von ARF, der für die Immortalisierung der MEFs^{ARF} durchgeführt wurde, könnte demnach eine Hemmung der Autophagie in den verwendeten MEFs bewirkt haben. Es wäre daher von Vorteil, alternative Wege der Immortalisierung zu finden, die mit einem Knockout von Genen einhergehen, für die eine Funktion in der Autophagie nicht bekannt sind. Odell und Kollegen veröffentlichten kürzlich einige Beispiele zur Immortalisierung von MEFs [Odell et al., 2010]. Allerdings ist für die meisten Gene, die für die Immortalisierung vorgeschlagen wurden, eine Interaktion mit ARF oder p53 bekannt, womit sie ebenfalls keine idealen Kandidaten für Untersuchungen der Autophagie darstellen.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Autophagie ist ein physiologischer und evolutionär hoch konservierter Prozess, bei dem zelluläre Bestandteile sequestriert und schließlich recycelt werden. Er ermöglicht es der Zelle, ihr Überleben unter Stressbedingungen zu sichern und sich veränderten Umweltbedingungen anzupassen. Hierfür werden Bestandteile des Zytoplasmas von einer Doppelmembran umschlossen, indem sich eine Phagophore bildet, die sich schrittweise verlängert und sich schließlich zu einem Autophagosom schließt. Das auf diese Weise sequestrierte zytoplasmatische Material wird einem Abbau durch lysosomale Enzyme zugeführt, indem das Autophagosom mit einem Lysosom fusioniert. An der Induktion der Autophagosomenbildung sowie an den einzelnen Reifungsschritten sind zahlreiche Proteine Autophagie-assoziiierter Gene beteiligt.

In Vorarbeiten gab es starke Hinweise dafür, dass der Transkriptionsfaktor Miz1 an der Regulation des autophagischen Prozesses beteiligt ist. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Genexpression von Miz1 durch AS-Entzug (EBSS Inkubation) induziert wird, was eine Rolle von Miz1 bei der Anpassung an nährstoffarme Bedingungen vermuten lässt. Auf morphologischer Ebene konnte die wichtige Funktion von Miz1 für den autophagischen Prozess bestätigt werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten einen Defekt der Reifung autophagischer Vakuolen in Zellen ohne Miz1 nachweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Defekt durch die Substitution von humanem Miz1 aufgehoben werden kann. Die Tatsache, dass auch eine Inkubation mit EBSS die Fähigkeit von Δ POZ Zellen zur Autophagosomenreifung wiederherstellte, legt nahe, dass der autophagische Prozess in embryonalen Fibroblasten während basaler oder stimulierter Autophagie auf unterschiedliche Art und Weise reguliert wird. Die Blockierung der Autophagosomenreifung scheint bei Autophagie-Induktion durch Miz1-unabhängige Mechanismen überwunden zu werden.

Um einzugrenzen, an welchen Teilschritten des autophagischen Prozesses Miz1 beteiligt ist, wurden Genexpressionsanalysen Autophagie-assoziiierter Gene in Zellen mit und ohne funktionstüchtigem Miz1 durchgeführt. Für die Experimente wurden embryonale Mausfibroblasten verwendet, die entweder nach dem 3T3-Protokoll immortalisiert worden waren (3T3 MEFs) oder durch einen shRNA vermittelten Knockdown von p19^{ARF} (MEFs^{ARF}). Die Messungen ergaben, dass die Expressionen der Autophagie-assoziierten Gene Atg9b und Atg16L2 während basaler Autophagie durch Miz1 reguliert werden. Zudem gab es Anhaltspunkte, dass möglicherweise noch weitere Gene des Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystems durch Miz1 reguliert werden könnten. Es konnte somit gezeigt werden, dass Miz1 auf molekularer Ebene einen Einfluss auf einige Teilschritte der Autophagie ausübt und zwar insbesondere auf Schritte der Reifung von Autophagosomen. Diese Ergebnisse auf Genexpressionsebene ergänzen die auf morphologischer Ebene gefundenen Hinweise auf gravierende Defekte in Zellen während der Reifung von Autophagosomen die lediglich

das trunkierte Miz1 aufwiesen. Die Initiation der Autophagie scheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit weitgehend unabhängig von Miz1 zu verlaufen. Darauf lassen die unveränderten Genexpressionen von ULK1 und ULK2 in Zellen mit oder ohne Miz1 schließen. Bestätigt wurde dies zudem durch die Tatsache, dass sowohl in Zellen mit als auch in Zellen ohne Miz1 autophagische Vakuolen ausgebildet wurden.

Es ist bekannt, dass Miz1 seine transkriptionelle Aufgabe in Zusammenarbeit mit verschiedenen Partnern vollbringt. Es konnte gezeigt werden, dass Miz1 die Genexpression seines wichtigsten Partners Myc reguliert. Außerdem legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass ARF, ein weiterer Partner von Miz1 und Myc, entscheidenden Einfluss auf Miz1 hat: ARF scheint sowohl die Genexpression von Miz1 als auch die Expressionsregulation anderer Gene durch Miz1 zu beeinflussen.

Um für zukünftige Ansätze den Einfluss von Miz1 auf die Autophagie weiter aufzuklären, ist es sinnvoll, weitere detaillierte morphologische Untersuchungen durchzuführen. Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass die Genexpressionsanalyse einzelner Atg-Gene für Untersuchungen akut induzierter Autophagie weniger aufschlußreich ist. Den Ergebnissen nach zu urteilen, scheint akute Autophagie nicht durch veränderte Expressionsmuster von Atg-Genen reguliert zu werden. Es wäre denkbar, dass sich als Antwort auf die EBSS Inkubation zunächst die Expression von Miz1 ändert und erst längerfristig die Expressionen Autophagie-assoziiierter Gene angepasst werden. Dies würde bedeuten, dass bei Durchführung der Messungen sechs Stunden nach Autophagie-Induktion Änderungen der Genexpressionen von Atg-Genen nicht erfasst werden, da sie erst zu einem späteren Zeitpunkt eintreten.

5.2 Englische Zusammenfassung

Autophagy is a physiological and evolutionary highly conserved process in which cellular components are sequestered and then recycled. It enables the cell to secure its survival under starvation conditions and adapt to changing environmental situations. Cytoplasmic components are engulfed by a bilipidal membrane layer through formation of a phagophore which elongates gradually and finally closes to form an autophagosome. Fusion of the autophagosome with a lysosome enables the degradation of the sequestered cytoplasmic material by lysosomal enzymes. Numerous proteins of autophagy-related genes are involved in the induction of autophagosome formation as well as in the steps of maturation.

Previous work provided evidence that the transcription factor Miz1 is involved in the regulation of the autophagic process. Results of this work show that withdrawal of amino acids (incubation with EBSS) induces gene expression of Miz1 which hints to a role of Miz1 in the adaptation to starvation conditions. The importance of Miz1 for the autophagic process was confirmed on a morphological level. Electron microscopy showed a failure of maturation of autophagic vacuoles in cells lacking Miz1. Moreover, it could be shown that this defect could be abrogated by substitution of human Miz1. At the same time incubation with EBSS restored the ability for autophagosomal maturation in APOZ cells. These results indicate a different regulation of the autophagic process during basal or stimulated autophagy. After induction of autophagy the inhibition of autophagosomal maturation seems to be overcome by mechanisms independent of Miz1.

To further identify which steps of the autophagic process are influenced by Miz1 a series of gene expression analysis of autophagy-associated genes was carried out using cells with and without fully functional Miz1. Experiments were conducted in mouse embryonic fibroblasts that were either immortalized through 3T3 protocol (3T3 MEFs) or through knockdown of p19^{ARF} by shRNA (MEFs^{ARF}). Results of this work show that the expression of autophagy-associated genes Atg9b and Atg16L2 is regulated through Miz1 during basal autophagy. Moreover, evidence could be obtained that further genes of the ubiquitin-like conjugation system might be regulated through Miz1. It could therefore be shown that Miz1 has an effect on certain steps of autophagy on a molecular basis and that this influence is exerted mainly on steps of maturation of autophagosomes. These results obtained through analysis of gene expression complement morphological results showing severe maturation defects of autophagosomes in cells containing solely the truncated Miz1. Initiation of autophagy seems to take place largely independently of Miz1. This can be concluded from unchanged levels of gene expression of ULK1 and ULK2 in cells with or without Miz1. The previous findings were confirmed by the fact that autophagic vacuoles formed both in cells containing and in cells not containing fully functional Miz1.

It is well known that Miz1 exerts its transcriptional function in cooperation with several partners. It could be shown that Miz1 regulates gene expression of its most important partner Myc. Moreover the results obtained indicate that ARF, another partner of Miz1 and Myc, has substantial influence on Miz1: ARF seems to affect both gene expression of Miz1 and regulation of gene expression of other genes through Miz1.

To further define the influence of Miz1 on autophagy it might be useful to conduct more detailed morphological analysis. Results of this work suggest that analysis of gene expression of single Atg genes is not suitable for detecting mechanisms of acute induced autophagy. The results of this work suggest that autophagy is not regulated through altered expression patterns of Atg genes. Possibly it is the expression of Miz1 that is first adapted in response to incubation with EBSS whereas expression of autophagy-associated genes is modified only later. This would imply that modifications of gene expression of Atg genes are not detected when conducting experiments six hours after inducing autophagy because they only take place at a later date.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
a.d.	Reinstwasser
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBSS	Earl's balanced salt solution
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
LB	Luria Bertani
mA	Milliampere
MEF	Mausembryofibroblast
MEFs ^{ARF}	p19 ^{ARF} shRNA immortalisierte Mausembryofibroblasten
Miz1-ko	Miz1-POZ-Domäne Knockout
M	Molar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
pB-Miz1	pBABE <i>PURO</i> Miz1 Expressionsvektor

Abkürzungsverzeichnis

pB-Ø	pBABE <i>PUR</i> O Leervektor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-1,4,5-triphosphat
PI	Proteinaseinhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	short hairpin RNA
ss	einzelsträngig (single strand)
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid

Literaturverzeichnis

- Abida W M and Gu W (2008) p53-Dependent and p53-independent activation of autophagy by ARF. *Cancer Research*, **68**:352–357.
- Adhikary S and Eilers M (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**:635–645.
- Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S, Kogel U, Scheffner M, Helin K and Eilers M (2005) The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell*, **123**:409–421.
- Adhikary S, Peukert K, Karsunky H, Beuger V, Lutz W, Elsässer H, Möröy T and Eilers M (2003) Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation. *Molecular and Cellular Biology*, **23**:7648–7657.
- Axe E L, Walker S A, Manifava M, Chandra P, Roderick H L, Habermann A, Griffiths G and Ktistakis N T (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, **182**:685–701.
- Baba M, Takeshige K, Baba N and Ohsumi Y (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *The Journal of Cell Biology*, **124**:903–913.
- Balaburski G M, Hontz R D and Murphy M E (2010) p53 and ARF: unexpected players in autophagy. *Trends in Cell Biology*, **20**:363–369.
- Bardwell V J and Treisman R (1994) The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes & Development*, **8**:1664–1677.
- Bastard J P, Chambert S, Ceppa F, Coude M, Grapez E, Loric S, Muzeau F, Spyratos F, Poirier K, Copois V, Tse C and Bienvenu T (2002) [RNA isolation and purification methods]. *Annales De Biologie Clinique*, **60**:513–523.
- Basu S, Liu Q, Qiu Y and Dong F (2009) Gfi-1 represses CDKN2B encoding p15INK4B through interaction with Miz-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**:1433–1438.
- Besson A, Dowdy S F and Roberts J M (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental Cell*, **14**:159–169.

- Betin V M S and Lane J D (2009a) Atg4D at the interface between autophagy and apoptosis. *Autophagy*, **5**:1057–1059.
- Betin V M S and Lane J D (2009b) Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *Journal of Cell Science*, **122**:2554–2566.
- Blommaert E F, Luiken J J, Blommaert P J, van Woerkom G M and Meijer A J (1995) Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**:2320–2326.
- Bowen H, Biggs T E, Phillips E, Baker S T, Perry V H, Mann D A and Barton C H (2002) c-Myc represses and Miz-1 activates the murine natural resistance-associated protein 1 promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**:34997–35006.
- Brazil D P and Hemmings B A (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**:657–664.
- Budanov A V and Karin M (2008) p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, **134**:451–460.
- Burman C and Ktistakis N T (2010) Autophagosome formation in mammalian cells. *Seminars in Immunopathology*.
- Byfield M P, Murray J T and Backer J M (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**:33076–33082.
- Chen N and Karantza-Wadsworth V (2009) Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1793**:1516–1523.
- Chen Y and Klionsky D J (2011) The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of Cell Science*, **124**:161–170.
- Christie G R, Hajdich E, Hundal H S, Proud C G and Taylor P M (2002) Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**:9952–9957.
- Colell A, Ricci J, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse N J, Li C W, Mari B, Barbry P, Newmeyer D D, Beere H M and Green D R (2007) GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell*, **129**:983–997.
- Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison P R, Gasco M, Garrone O, Crook T and Ryan K M (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*, **126**:121–134.
- Crighton D, Wilkinson S and Ryan K M (2007) DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy*, **3**:72–74.

- Cuervo A M, Bergamini E, Brunk U T, Dröge W, French M and Terman A (2005) Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy*, **1**:131–140.
- Cuervo A M and Dice J F (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science (New York, N.Y.)*, **273**:501–503.
- De Meyer G R Y and Martinet W (2009) Autophagy in the cardiovascular system. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1793**:1485–1495.
- Dunn W A (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *The Journal of Cell Biology*, **110**:1935–1945.
- Esclatine A, Chaumorceau M and Codogno P (2009) Macroautophagy signaling and regulation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **335**:33–70.
- Eskelinen E (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy*, **1**:1–10.
- Eskelinen E (2008a) The mystery of the membranes. *Autophagy*, **4**:3–4.
- Eskelinen E (2008b) To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy*, **4**:257–260.
- Eskelinen E and Saftig P (2009) Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1793**:664–673.
- Feng Z, Zhang H, Levine A J and Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**:8204–8209.
- Funderburk S F, Wang Q J and Yue Z (2010) The Beclin 1-VPS34 complex—at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in Cell Biology*, **20**:355–362.
- Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S and Kamata T (2004) Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene*, **23**:3898–3904.
- Garcia V, Furuya K and Carr A M (2005) Identification and functional analysis of TopBP1 and its homologs. *DNA Repair*, **4**:1227–1239.
- Gebhardt A, Frye M, Herold S, Benitah S A, Braun K, Samans B, Watt F M, Elsässer H and Eilers M (2006) Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *The Journal of Cell Biology*, **172**:139–149.
- Gebhardt A, Kosan C, Herkert B, Mörry T, Lutz W, Eilers M and Elsässer H (2007) Miz1 is required for hair follicle structure and hair morphogenesis. *Journal of Cell Science*, **120**:2586–2593.
- Geng J, Baba M, Nair U and Klionsky D J (2008) Quantitative analysis of autophagy-related protein stoichiometry by fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*, **182**:129–140.

- Geng J and Klionsky D J (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Reports*, **9**:859–864.
- Glick D, Barth S and Macleod K F (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, **221**:3–12.
- Gwinn D M, Shackelford D B, Egan D F, Mihaylova M M, Mery A, Vazquez D S, Turk B E and Shaw R J (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, **30**:214–226.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H and Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, **441**:885–889.
- Harding T M, Hefner-Gravink A, Thumm M and Klionsky D J (1996) Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**:17621–17624.
- He C, Baba M, Cao Y and Klionsky D J (2008) Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, **19**:5506–5516.
- He C and Klionsky D J (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, **43**:67–93.
- Hemelaar J, Lelyveld V S, Kessler B M and Ploegh H L (2003) A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**:51841–51850.
- Herkert B, Dwertmann A, Herold S, Abed M, Naud J, Finkernagel F, Harms G S, Orian A, Wanzel M and Eilers M (2010) The Arf tumor suppressor protein inhibits Miz1 to suppress cell adhesion and induce apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, **188**:905–918.
- Herold S, Hock A, Herkert B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen R, Bernards R and Eilers M (2008) Miz1 and HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1. *The EMBO Journal*, **27**:2851–2861.
- Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaioja J, Saluz H, Haenel F and Eilers M (2002) Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Molecular Cell*, **10**:509–521.
- Honda R and Yasuda H (1999) Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *The EMBO Journal*, **18**:22–27.
- Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S i, Natsume T, Hara T and Mizushima N (2009) Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, **5**:973–979.

- Huang J and Klionsky D J (2007) Autophagy and human disease. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, **6**:1837–1849.
- Humbey O, Pimkina J, Zilfou J T, Jarnik M, Dominguez-Brauer C, Burgess D J, Eischen C M and Murphy M E (2008) The ARF tumor suppressor can promote the progression of some tumors. *Cancer Research*, **68**:9608–9613.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T and Ohsumi Y (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, **408**:488–492.
- Jin S (2006) Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis. *Autophagy*, **2**:80–84.
- Jones R G, Plas D R, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum M J and Thompson C B (2005) AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, **18**:283–293.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y and Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *The EMBO Journal*, **19**:5720–5728.
- Kamijo T, Zindy F, Roussel M F, Quelle D E, Downing J R, Ashmun R A, Grosveld G and Sherr C J (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, **91**:649–659.
- Kelly K F and Daniel J M (2006) POZ for effect–POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends in Cell Biology*, **16**:578–587.
- Kerscher O, Felberbaum R and Hochstrasser M (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **22**:159–180.
- Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld T P and Guan K (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature Cell Biology*, **10**:935–945.
- Kim J, Kundu M, Viollet B and Guan K (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*.
- Kime L and Wright S C (2003) Mad4 is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc. *The Biochemical Journal*, **370**:291–298.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T and Ohsumi Y (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of Cell Biology*, **151**:263–276.
- Klionsky D J, Cregg J M, Dunn W A, Emr S D, Sakai Y, Sandoval I V, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M and Ohsumi Y (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, **5**:539–545.

- Klionsky D J and Lane J D (2010) Alternative macroautophagy. *Autophagy*, **6**:201.
- Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, Tanaka K and Uchiyama Y (2008) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *The American Journal of Pathology*, **172**:454–469.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J i, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E and Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, **441**:880–884.
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K and Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, **169**:425–434.
- Koonin E V (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, **39**:309–338.
- Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman R J, Kominami E and Momoi T (2007) ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death and Differentiation*, **14**:230–239.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T and Mizushima N (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, **432**:1032–1036.
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N and Ohsumi Y (2002) Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**:18619–18625.
- Kundu M and Thompson C B (2008) Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annual Review of Pathology*, **3**:427–455.
- Lee J W, Park S, Takahashi Y and Wang H (2010) The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One*, **5**:e15394.
- Levine B and Abrams J (2008) p53: The Janus of autophagy? *Nature Cell Biology*, **10**:637–639.
- Levine B and Klionsky D J (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, **6**:463–477.
- Li D, Wang L, Deng R, Tang J, Shen Y, Guo J, Wang Y, Xia L, Feng G, Liu Q Q, Huang W, Zeng Y and Zhu X (2009) The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene*, **28**:886–898.

- Liao X, Majithia A, Huang X and Kimmel A R (2008) Growth control via TOR kinase signaling, an intracellular sensor of amino acid and energy availability, with crosstalk potential to proline metabolism. *Amino Acids*, **35**:761–770.
- Liu Q, Basu S, Qiu Y, Tang F and Dong F (2010) A role of Miz-1 in Gfi-1-mediated transcriptional repression of CDKN1A. *Oncogene*, **29**:2843–2852.
- Livak K J and Schmittgen T D (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, **25**:402–408.
- Lum J J, DeBerardinis R J and Thompson C B (2005) Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **6**:439–448.
- Lünemann J D, Schmidt J, Dalakas M C and Münz C (2007) Macroautophagy as a pathomechanism in sporadic inclusion body myositis. *Autophagy*, **3**:384–386.
- Maiuri M C, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik S A and Kroemer G (2010) Autophagy regulation by p53. *Current Opinion in Cell Biology*, **22**:181–185.
- Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N and López-Otín C (2007) Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**:18573–18583.
- Mariño G, Uría J A, Puente X S, Quesada V, Bordallo J and López-Otín C (2003) Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**:3671–3678.
- Martinet W, Knaapen M W M, Kockx M M and De Meyer G R Y (2007) Autophagy in cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine*, **13**:482–491.
- Mehrpour M, Esclatine A, Beau I and Codogno P (2010a) Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, **298**:C776–785.
- Mehrpour M, Esclatine A, Beau I and Codogno P (2010b) Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research*, **20**:748–762.
- Mello C C and Conte D (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature*, **431**:338–342.
- Menzies F M, Moreau K and Rubinsztein D C (2010) Protein misfolding disorders and macroautophagy. *Current Opinion in Cell Biology*.
- Mercer C A, Kaliappan A and Dennis P B (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, **5**:649–662.
- Miao L, Song Z, Jin L, Zhu Y M, Wen L P and Wu M (2010) ARF antagonizes the ability of Miz-1 to inhibit p53-mediated transactivation. *Oncogene*, **29**:711–722.

- Mijaljica D, Prescott M and Devenish R J (2010) Autophagy in disease. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **648**:79–92.
- Mizushima N (2009) Physiological functions of autophagy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **335**:71–84.
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y and Yoshimori T (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science*, **116**:1679–1688.
- Mizushima N and Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*, **12**:823–830.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo A M and Klionsky D J (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **451**:1069–1075.
- Mizushima N, Noda T and Ohsumi Y (1999) Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *The EMBO Journal*, **18**:3888–3896.
- Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George M D, Klionsky D J, Ohsumi M and Ohsumi Y (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, **395**:395–398.
- Mizushima N, Yoshimori T and Levine B (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, **140**:313–326.
- Mäkinen M, Hillukkala T, Tuusa J, Reini K, Vaara M, Huang D, Pospiech H, Majuri I, Westerling T, Mäkelä T P and Syväoja J E (2001) BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**:30399–30406.
- Müller M (2008) *Das lysosomal-autophagische Kompartiment in Miz1-POZ-Domäne knockout MEFs*. Ph.D. thesis.
- Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N and Otsu K (2007) The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature Medicine*, **13**:619–624.
- Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y and Shimizu S (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*, **461**:654–658.
- Noda T, Kim J, Huang W P, Baba M, Tokunaga C, Ohsumi Y and Klionsky D J (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *The Journal of Cell Biology*, **148**:465–480.
- Odell A, Askham J, Whibley C and Hollstein M (2010) How to become immortal: let MEFs count the ways. *Aging*, **2**:160–165.

- Oppenheimer S (2009) *Betrachtung der Autophagie und der Genexpression Autophagie-assoziiierter Gene in Miz1-POZ-Domäne knockout MEFs*. Ph.D. thesis, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg.
- Pattingre S, Bauvy C and Codogno P (2003) Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**:16667–16674.
- Peukert K, Staller P, Schneider A, Carmichael G, Hänel F and Eilers M (1997) An alternative pathway for gene regulation by Myc. *The EMBO Journal*, **16**:5672–5686.
- Phan R T, Saito M, Basso K, Niu H and Dalla-Favera R (2005) BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nature Immunology*, **6**:1054–1060.
- Piluso D, Bilan P and Capone J P (2002) Host cell factor-1 interacts with and antagonizes transactivation by the cell cycle regulatory factor Miz-1. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**:46799–46808.
- Pimkina J, Humbey O, Zilfou J T, Jarnik M and Murphy M E (2009) ARF induces autophagy by virtue of interaction with Bcl-xl. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**:2803–2810.
- Pimkina J and Murphy M E (2009) ARF, autophagy and tumor suppression. *Autophagy*, **5**:397–399.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois N J, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee H W, Cordon-Cardo C and DePinho R A (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, **92**:713–723.
- Quelle D E, Zindy F, Ashmun R A and Sherr C J (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, **83**:993–1000.
- Radtke A L and O’Riordan M X D (2006) Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cellular Microbiology*, **8**:1720–1729.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies J E, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson Z W, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk V I, Lichtenberg M, Luo S, Massey D C O, Menzies F M, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi F H, Underwood B R, Winslow A R and Rubinsztajn D C (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, **90**:1383–1435.
- Reef S and Kimchi A (2008) Nucleolar p19ARF, unlike mitochondrial smARF, is incapable of inducing p53-independent autophagy. *Autophagy*, **4**:866–869.

- Reef S, Zalckvar E, Shifman O, Bialik S, Sabanay H, Oren M and Kimchi A (2006) A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Molecular Cell*, **22**:463–475.
- REYNOLDS E S (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, **17**:208–212.
- Roussel M, Saule S, Lagrou C, Rommens C, Beug H, Graf T and Stehelin D (1979) Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature*, **281**:452–455.
- Ryan K M (2010) p53 and autophagy in cancer: Guardian of the genome meets guardian of the proteome. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*.
- Ryter S W, Lee S and Choi A M (2010) Autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Review of Respiratory Medicine*, **4**:573–584.
- Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T and Akira S (2009) Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**:20842–20846.
- Salghetti S E, Kim S Y and Tansey W P (1999) Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *The EMBO Journal*, **18**:717–726.
- Sancak Y, Peterson T R, Shaul Y D, Lindquist R A, Thoreen C C, Bar-Peled L and Sabatini D M (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, N.Y.)*, **320**:1496–1501.
- Sarbassov D D, Ali S M and Sabatini D M (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, **17**:596–603.
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L and Elazar Z (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal*, **26**:1749–1760.
- Schlumpberger M, Schaeffeler E, Straub M, Bredschneider M, Wolf D H and Thumm M (1997) AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **179**:1068–1076.
- Seoane J, Le H and Massagué J (2002) Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature*, **419**:729–734.
- Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M and Massagué J (2001) TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nature Cell Biology*, **3**:400–408.

- Shaw R J (2009) LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, **196**:65–80.
- Shimizu S, Arakawa S and Nishida Y (2010) Autophagy takes an alternative pathway. *Autophagy*, **6**:290–291.
- Smale S T and Baltimore D (1989) The initiator is a transcription control element. *Cell*, **57**:103–113.
- Staller P, Peukert K, Kiermaier A, Seoane J, Lukas J, Karsunky H, Möry T, Bartek J, Massagué J, Hänel F and Eilers M (2001) Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nature Cell Biology*, **3**:392–399.
- Stead M A, Trinh C H, Garnett J A, Carr S B, Baron A J, Edwards T A and Wright S C (2007) A beta-sheet interaction interface directs the tetramerisation of the Miz-1 POZ domain. *Journal of Molecular Biology*, **373**:820–826.
- Stogios P J, Cuesta-Seijo J A, Chen L, Pomroy N C and Privé G G (2010) Insights into strand exchange in BTB domain dimers from the crystal structures of FAZF and Miz1. *Journal of Molecular Biology*, **400**:983–997.
- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T and Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO Journal*, **20**:5971–5981.
- Takahashi Y, Meyerkord C L, Hori T, Runkle K, Fox T E, Kester M, Loughran T P and Wang H (2011) Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*, **7**:61–73.
- Takahashi Y, Meyerkord C L and Wang H (2008) BARGaining membranes for autophagosome formation: Regulation of autophagy and tumorigenesis by Bif-1/Endophilin B1. *Autophagy*, **4**:121–124.
- Takehige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T and Ohsumi Y (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *The Journal of Cell Biology*, **119**:301–311.
- Tanida I, Sou Y s, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T and Kominami E (2004) HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**:36268–36276.
- Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumberger M, Straub M, Veenhuis M and Wolf D H (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **349**:275–280.

- TODARO G J and GREEN H (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology*, **17**:299–313.
- Tooze S A and Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology*, **12**:831–835.
- Tschan M P and Simon H (2010) The role of autophagy in anticancer therapy: promises and uncertainties. *Journal of Internal Medicine*, **268**:410–418.
- Tsukada M and Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **333**:169–174.
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis A P, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R and Clevers H (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, **111**:241–250.
- Vergne I and Deretic V (2010) The role of PI3P phosphatases in the regulation of autophagy. *FEBS Letters*, **584**:1313–1318.
- Vergne I, Roberts E, Elmaoued R A, Tosch V, Delgado M A, Proikas-Cezanne T, Laporte J and Deretic V (2009) Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *The EMBO Journal*, **28**:2244–2258.
- Walisko O, Izsvák Z, Szabó K, Kaufman C D, Herold S and Ivics Z (2006) Sleeping Beauty transposase modulates cell-cycle progression through interaction with Miz-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**:4062–4067.
- Wang J, Lian H, Zhao Y, Kauss M A and Spindel S (2008) Vitamin D3 induces autophagy of human myeloid leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**:25596–25605.
- Wang R C and Levine B (2010) Autophagy in cellular growth control. *FEBS Letters*, **584**:1417–1426.
- Wanzel M, Herold S and Eilers M (2003) Transcriptional repression by Myc. *Trends in Cell Biology*, **13**:146–150.
- Wanzel M, Kleine-Kohlbrecher D, Herold S, Hock A, Berns K, Park J, Hemmings B and Eilers M (2005) Akt and 14-3-3 β regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nature Cell Biology*, **7**:30–41.
- Wanzel M, Russ A C, Kleine-Kohlbrecher D, Colombo E, Pelicci P and Eilers M (2008) A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nature Cell Biology*, **10**:1051–1061.
- Webber J L and Tooze S A (2010a) Coordinated regulation of autophagy by p38 α MAPK through mAtg9 and p38IP. *The EMBO Journal*, **29**:27–40.

- Webber J L and Tooze S A (2010b) New insights into the function of Atg9. *FEBS Letters*, **584**:1319–1326.
- Webber J L, Young A R J and Tooze S A (2007) Atg9 trafficking in Mammalian cells. *Autophagy*, **3**:54–56.
- Weber A, Marquardt J, Elzi D, Forster N, Starke S, Glaum A, Yamada D, Defossez P, Delrow J, Eisenman R N, Christiansen H and Eilers M (2008) Zbtb4 represses transcription of P21CIP1 and controls the cellular response to p53 activation. *The EMBO Journal*, **27**:1563–1574.
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M and Levine B (2008) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular Cell*, **30**:678–688.
- Xie Z and Klionsky D J (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, **9**:1102–1109.
- Xie Z, Nair U and Klionsky D J (2008) Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Molecular Biology of the Cell*, **19**:3290–3298.
- Yamada T, Carson A R, Caniggia I, Umebayashi K, Yoshimori T, Nakabayashi K and Scherer S W (2005) Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**:18283–18290.
- Yang Z and Klionsky D J (2009) An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **335**:1–32.
- Yang Z and Klionsky D J (2010a) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, **12**:814–822.
- Yang Z and Klionsky D J (2010b) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, **22**:124–131.
- Yin X, Ding W and Gao W (2008) Autophagy in the liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **47**:1773–1785.
- Young A R J, Chan E Y W, Hu X W, Köchl R, Crawshaw S G, High S, Hailey D W, Lippincott-Schwartz J and Tooze S A (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science*, **119**:3888–3900.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine A J and Heintz N (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**:15077–15082.
- Yuk J, Shin D, Lee H, Yang C, Jin H S, Kim K, Lee Z, Lee S, Kim J and Jo E (2009) Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host & Microbe*, **6**:231–243.

- Zalcvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R and Kimchi A (2009) DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Reports*, **10**:285–292.
- Zhu H, Wu H, Liu X, Li B, Chen Y, Ren X, Liu C and Yang J (2009) Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy*, **5**:816–823.
- Ziegelbauer J, Shan B, Yager D, Larabell C, Hoffmann B and Tjian R (2001) Transcription factor MIZ-1 is regulated via microtubule association. *Molecular Cell*, **8**:339–349.
- Ziegelbauer J, Wei J and Tjian R (2004) Myc-interacting protein 1 target gene profile: a link to microtubules, extracellular signal-regulated kinase, and cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**:458–463.
- Zindy F, Williams R T, Baudino T A, Rehg J E, Skapek S X, Cleveland J L, Roussel M F and Sherr C J (2003) Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**:15930–15935.

Anhang

Abhängigkeit der Genexpression von der POZ-Domäne von Miz1 bei Kultivierung in Vollmedium

Einteilung für 3T3 MEFs		
Bezeichnung	Beschreibung	Gene
3T3 1-1	Miz1-unabhängige Expression	ULK1, ULK2, Atg4a, Atg4b, Atg5, Atg7, Atg9a, Atg12, Atg16L1
3T3 1-2	Unbestimmte Miz1-Abhängigkeit der Expression	Atg3, LC3a, LC3b, Atg9b, Atg10, Myc
3T3 1-3	Miz1-abhängige Expression	Atg4c, Atg4d, Atg16L2
Einteilung für MEFs ^{ARF}		
Bezeichnung	Beschreibung	Gene
ARF 1-1	Miz1-unabhängige Expression	ULK2, Atg3, Atg4b, Atg7, LC3a, LC3b, Atg9a, Atg12
ARF 1-2	Unbestimmte Miz1-Abhängigkeit der Expression	ULK1, Atg4a, Atg4c, Atg4d, Atg5, Atg10, Atg16L1
ARF 1-3	Miz1-abhängige Expression	Atg9b, Atg16L2, Myc
Einteilung für mit pB- \emptyset bzw. pB-Miz1 infizierte 3T3 MEFs		
Bezeichnung	Beschreibung	Gene
Inf3T3 1-1	hMiz1-unabhängige Expression	ULK1, ULK2, Atg4a, Atg4b, Atg4c, Atg4d, Atg5, Atg7, LC3a, LC3b, Atg9a, Atg9b, Atg10, Atg12, Atg16L1, Atg16L2, Myc
Inf3T3 1-3	hMiz1-abhängige Expression	Atg3

... Fortsetzung

Fortsetzung ...

Einteilung für mit pB- \emptyset bzw. pB-Miz1 infizierte MEFs ^{ARF}		
Bezeichnung	Beschreibung	Gene
<i>InfARF</i> 1-1	hMiz1-unabhängige Expression	ULK1, ULK2, Atg4b, Atg4c, Atg4d, LC3a, Atg9a, Atg12, Atg16L1, Atg16L2, Myc
<i>InfARF</i> 1-3	hMiz1-abhängige Expression	Atg3, Atg4a, Atg5, Atg7, LC3b, Atg9b, Atg10

Tabelle A.1: Übersicht über die Einteilung der Gene hinsichtlich der Abhängigkeit ihrer Genexpression von der POZ-Domäne von Miz1 bei Kultivierung in Vollmedium. Aus Gründen einer besseren Übersichtlichkeit werden die Begriffe „Miz1-abhängig bzw. -unabhängig“ synonym gebraucht für „Abhängigkeit von der POZ-Domäne von Miz1“. Die Gene sind in drei Gruppen eingeteilt, wobei die Gene aus Gruppe 1-1 Miz1-unabhängig und die Gene aus Gruppe 1-3 Miz1-abhängig exprimiert wurden. Für die Gene aus Gruppe 1-2 konnte eine Abhängigkeit der Genexpression von der POZ-Domäne nicht bestimmt werden. Die Genexpressionen wurden in 3T3 MEFs, in MEFs^{ARF}, sowie in infizierten Δ POZ-Zellen von 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} gemessen und die Gene jeweils in eine der drei Gruppen eingeteilt. Die Zuordnung zu den Gruppen erfolgte für 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} durch Vergleich der Genexpressionen in Wildtypzellen und Δ POZ-Knockoutzellen jeweils unter DMEM-Bedingungen. Die Einteilung für infizierte 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} erfolgte durch Vergleich der Genexpressionen in mit pB- \emptyset und mit pB-Miz1 infizierten Δ POZ-Zellen ebenfalls unter DMEM-Bedingungen. Für die infizierten Zellen existiert keine Gruppe 1-2, da die Auswertung der Genexpressionsmessungen auf dem Mittelwert von drei Messungen (3T3 MEFs) bzw. auf den Daten einer Einzelmessung (MEFs^{ARF}) beruhen. Somit war eine eindeutige Zuordnung zu Gruppe 1-1 oder 1-3 möglich. Die Auswertung für die nicht-infizierten Zellen beruht auf den Daten zweier Messwiederholungen.

Regulation der Genexpression durch EBSS und Einfluss der POZ-Domäne von Miz1

Bezeichnung	Einteilung für 3T3 MEFs		Gene
	Beschreibung		
3T3 2-1	Keine Regulation durch EBSS		Atg4a, Atg5
3T3 2-2	Regulation durch EBSS unbestimmt		Atg3, Atg4b, Atg4d, Myc
3T3 2-3	Regulation durch EBSS	Miz1-unabhängige Regulation durch EBSS	ULK2, Atg4c, Atg7, LC3b, Atg12
3T3 2-4		Unbestimmte Miz1-Abhängigkeit der Regulation durch EBSS	ULK1, LC3a, Atg9a, Atg10, Atg16L1, Atg16L2
3T3 2-5		Miz1-abhängige Regulation durch EBSS	Atg9b

Bezeichnung	Einteilung für MEFs ^{ARF}		Gene
	Beschreibung		
ARF 2-1	Keine Regulation durch EBSS		—
ARF 2-2	Regulation durch EBSS unbestimmt		Atg3, Atg4a, Atg4c, Atg5
ARF 2-3	Regulation durch EBSS	Miz1-unabhängige Regulation durch EBSS	ULK2, Atg4b, Atg9a, Atg10, Atg12, Atg16L2
ARF 2-4		Unbestimmte Miz1-Abhängigkeit der Regulation durch EBSS	ULK1, Atg4d, Atg7, LC3a, LC3b, Atg9b, Atg16L1
ARF 2-5		Miz1-abhängige Regulation durch EBSS	Myc

Einteilung für mit pB- \emptyset bzw. pB-Miz1 infizierte 3T3 MEFs			
Bezeichnung	Beschreibung		Gene
Inf3T3 2-1	Keine Regulation durch EBSS		—
Inf3T3 2-3	Regulation durch EBSS	hMiz1-unabhängige Regulation durch EBSS	ULK1, ULK2, Atg4a, Atg4c, Atg4d, Atg5, Atg7, LC3a, LC3b, Atg9a, Atg12, Atg16L2, Myc
Inf3T3 2-5		hMiz1-abhängige Regulation durch EBSS	Atg3, Atg4b, Atg9b, Atg10, Atg16L1

... Fortsetzung

Einteilung für mit pB- \emptyset bzw. pB-Miz1 infizierte 3T3 MEFs			
Bezeichnung	Beschreibung		Gene
<i>InfARF</i> 2-1	Keine Regulation durch EBSS		—
<i>InfARF</i> 2-3	} Regulation durch EBSS	hMiz1-unabhängige Regulation durch EBSS	ULK1, ULK2, Atg4c, Atg4d, Atg16L1, Atg16L2
<i>InfARF</i> 2-5		hMiz1-abhängige Regulation durch EBSS	Atg3, Atg4a, Atg4b, Atg5, Atg7, LC3a, LC3b, Atg9a, Atg9b, Atg10, Atg12, Myc

Tabelle A.2: Übersicht über die Einteilung der Gene hinsichtlich der Regulation ihrer Expression durch EBSS. Die Gene sind in fünf Gruppen eingeteilt, wobei die Gene aus Gruppe 2-1 nicht durch EBSS reguliert wurden. Für die Gene aus Gruppe 2-2 konnte eine Regulation der Genexpression durch EBSS nicht bestimmt werden. Die Gruppen 2-3 bis 2-5 fassen die Gene zusammen, für die eine Regulation durch EBSS nachgewiesen werden konnte. Sie wurden weiter unterteilt, je nachdem ob die Regulation durch EBSS Miz1-unabhängig (Gruppe 2-3) oder Miz1-abhängig (Gruppe 2-5) erfolgte. Die Gene aus Gruppe 2-4 wurden zwar durch EBSS reguliert, eine Abhängigkeit der Regulation durch EBSS von der POZ-Domäne konnte allerdings nicht bestimmt werden. Aus Gründen einer besseren Übersichtlichkeit werden die Begriffe „Miz1-abhängige bzw. -unabhängige Regulation“ synonym gebraucht für „Abhängigkeit der Regulation von der POZ-Domäne von Miz1“. Die Genexpressionen wurden in 3T3 MEFs, in MEFs^{ARF}, sowie in infizierten Δ POZ-Zellen von 3T3 MEFs und MEFs^{ARF} gemessen und die Gene jeweils in eine der fünf Gruppen eingeteilt. Für die infizierten Zellen existieren keine Gruppen 2-2 und 2-4, da die Auswertung der Genexpressionsmessungen auf dem Mittelwert von drei Messungen (3T3 MEFs) bzw. auf den Daten einer Einzelmessung (MEFs^{ARF}) beruhen. Somit war eine eindeutige Zuordnung zu Gruppe 2-1, 2-3 oder 2-5 möglich. Die Auswertung für die nicht-infizierten Zellen beruht auf den Daten zweier Messwiederholungen.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aumüller, Basler, Baum, Baumann, Boudriot, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Elsässer, Feuser, Gerdes, Grundmann, Hassel, Heilmann, Hermann-Lingen, Hertl, Hilt, Hörle, Jerrentrup, Jungclas, Kanngießer, Kirchner, Klose, Koolman, Lang, Lill, Lohoff, Mandrek, Marahiel, Moll, Mueller, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Oeffner, Oertel, Opitz, Portenier, Plant, Reiß, Renz, Richter, Riße, Röper, Rothmund, Schäfer, Schofer, Schmidt, Schrader, Vogelmeier, Wagner, Werner, Westermann, Wulf

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Universität Valladolid waren in alphabetischer Reihenfolge die Damen und Herren:

Blanco Quirós, Conde López, Gil-Carcedo García, Gutierrez Rey, Ojeda Ortego, Pastor Jimeno

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Elsässer für die Bereitstellung des interessanten Themas, die geduldige und engagierte Betreuung und die richtungsweisenden Hinweise danken, die entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit waren. Ich möchte ihm darüberhinaus für die vielen praktischen Fertigkeiten danken, die er mir im Labor beigebracht hat.

Der AG Bauer möchte ich für die Möglichkeit, das qRT PCR Gerät nutzen zu können, herzlich danken. Ein großes Dankeschön auch an Barbara Herkert, AG Eilers, Biozentrum Würzburg für die Bereitstellung der verwendeten Plasmide und Zelllinien. Mareike Müller, AG Elsässer danke ich für die Überlassung der verwendeten pBABE Viren.

Mein besonderer Dank gilt der AG Elsässer, die mich sehr herzlich in der Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist. Ihr habt mir als „Labor-Neuling“ mit eurer Hilfsbereitschaft und einer guten Arbeitsatmosphäre das Leben sehr erleichtert. Bei Jan Hönnemann und Nadime Ünver bedanke ich mich für die vielen Tipps und Tricks, die sehr dabei geholfen haben den Laboralltag zu meistern. Mareike Müller möchte ich darüberhinaus sehr für ihre unermüdlichen Hilfestellungen danken, ohne die diese Arbeit womöglich öfter mal ins Stocken geraten wäre. Vielen Dank auch an Ursula Lehr, die mir in allen Fragen zur Zellkultur zur Seite gestanden ist und an Volkwin Kramer für die technische Unterstützung dieser Arbeit. Brigitte Agricola möchte ich für die Unterstützung in der Elektronenmikroskopie danken.

Bei meinem Vater möchte ich mich von Herzen für die immer blitzschnelle Problembewältigung in allen Computerfragen bedanken. Er hat mich wesentlich bei der Textverarbeitung und der graphischen Umsetzung unterstützt. Außerdem danke ich meinem Bruder Niklas für die Vermittlung der „physikalischen Sicht auf die Dinge“ und die kritischen Fragen, die entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Meinem Freund Björn Regulski danke ich sehr für seine Geduld und die vielen aufmunternden Worte während dieser Arbeit. Vielen Dank auch für das fleißige Korrekturlesen, die wertvollen Tipps und nicht zu vergessen die Überzeugung, dass auch mal Feierabend sein muss.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir dieses Studium und diese Doktorarbeit ermöglicht und mich immer und in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Marburg, 06.08.2012

Sophie Berliner